

Tartu Ülikool
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut

Mari Sild

**Lahuse pH ja lisandite mõju
ionisatsiooniefektiivsusele ESI allikas**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad: Anneli Kruve, PhD
Jaanus Liigand, MSc

Tartu 2016

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS.....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1. ESI allikas	5
1.2. Ionisatsiooniefektiivsus	7
1.3. Pöörd-ESI	10
2. MATERJALID, APARATUUR JA MEETODID	12
2.1. Kasutatud ained	12
2.2. Aparatuur	13
2.3. Meetodid	13
2.4. Arvutused	15
3. TULEMUSED	16
3.1. Ionisatsiooniefektiivsuse uurimine vees ja metanoolis	16
3.2. Pöörd-ESI nähtuse uurimine	21
3.3. Lisandi koostise mõju uurimine	23
3.4. Lisandi kontsentratsiooni mõju uurimine	26
4. TULEMUSTE ARUTELU	28
4.1. Ionisatsiooniefektiivsuse uurimine vees ja metanoolis	28
4.2. Pöörd-ESI nähtuse uurimine	30
4.3. Lisandi koostise mõju uurimine	31
4.4. Lisandi kontsentratsiooni mõju uurimine	34
4.5. Ionisatsiooniefektiivsuste modelleerimine	35
KOKKUVÕTE.....	36
SUMMARY	37
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	38
LISAD	41

KASUTATUD LÜHENDID

MS	massispektromeetria
ESI	elektropihustusionisatsioon
LC	vedelikkromatograafia
$\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$	negatiivne kümnendlogaritm vesilahuse vesinikioonide kontsentratsioonist
pH^{MeOH}	negatiivne kümnendlogaritm metanoolilahuse vesinikioonide kontsentratsioonist
$\text{p}K_{\text{a}}^{\text{H}_2\text{O}}$	happe dissotsiatsioonikonstandi negatiivne kümnendlogaritm vees
$\text{p}K_{\text{a}}^{\text{MeOH}}$	happe dissotsiatsioonikonstandi negatiivne kümnendlogaritm metanoolis
$\log P$	oktanool-vesi jaotuskoefitsiendi kümnendlogaritm
PA	prootonafiinsus (gaasifaasiline)
MD	molekulaardünaamika
$\log IE$	ionisatsiooniefektiivsuse kümnendlogaritm
3Q	kolmekordne kvadrupool
TFA	trifluoroäädikhape
TMA^+	tetrametüülammoonium

SISSEJUHATUS

Massispektromeetria (MS) koos elektropihustuse ionisatsiooniallikaga (ESI) on maailmas üks enim kasutatud analüüsimeetod nii tundmatute ühendite kindlakstegemiseks kui ka tuvastatud ühendite sisalduse määramiseks. ESI võimaldab ühendada massispektromeetria ja vedelikkromatograafia (LC), mis kokku moodustavad asendamatu tandemi paljudes analüüsilaborites alates ravimitööstusest kuni keskkonnauuringute laboriteni.

Vaatamata meetodi populaarsusele ei ole täpselt teada, kuidas ionisatsiooniprotsessid ESI allikas toimuvad ning millest sõltub analüütide ionisatsiooniefektiivsus. Seetõttu on kvantitatiivsel analüüsil vaja kasutada standardaineid. Selleks, et muuta kvantitatiivseid uuringuid kiiremaks ja standardainevabaks, on vajalik ESI protsessi ionisatsiooniefektiivsuse fundamentaalne uurimine.

Ionisatsiooniefektiivsuse sõltuvust analüüdi omadustest on uuritud mitmel pool maailmas. Samuti on uuritud, kuidas ionisatsiooniefektiivsust mõjutavad erinevad lahuse omadused ja lisandid. Enamasti on sellised uuringud tehtud vesi-orgaanika segudes, kus ei ole kõik analüütide ja lahuste omadused alati teada. Näiteks ei ole teada, kuidas muutub ESI protsessi käigus lahuse koostis ning milline on segu pH.

Töö eesmärk oli uurida, kuidas mõjutavad ionisatsiooniefektiivsust ESI allikas lahuse pH ning lisandid. Et vähendada tundmatute parameetrite arvu, valiti ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmisel lahustiteks puhas vesi ning metanool. Samuti uuriti, kuidas ionisatsiooniefektiivsus sõltub lisandi kontsentratsioonist ning lisandi koostises olevast vastasioonist.

Töös uuriti 10 analüüdi ionisatsiooniefektiivsusi 28 erineva koostise ja pH väärtusega vesilahuses, $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtuste vahemikuks oli 1,42 kuni 10,29. Metanoolis uuriti samade analüütide ionisatsiooniefektiivsusi 14 erineva koostise ning pH väärtusega metanoolilahuses, pH^{MeOH} väärtuste vahemikuks oli 3,63 kuni 12,24.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Massispektromeetria (MS) on viimase poolsajandi jooksul arenenud väga kiiresti. Üha uute ionisatsioonimeetodite leiutamise ja täiustamisega on sellest saanud üks maailma hinnatumaid ja enimkasutatavaid analüüsimeetodeid. [1]

Elektropihustuse (ESI) tööpõhimõtte kasutamine massispektromeetri ionisatsiooniallikana 1980. aastatel lõi ESI/MS tehnoloogia ning võimaldas MS-i ühendada vedelikkromatograafiaga (LC). LC/MS võimaldab lahustest määrata nii väikeseid kui ka suuri (kuni ca 100 kilodaltonit) molekule ning on seega vajalik töövahend nii keemia-, ravimi- ja toiduainetööstustes kui ka meditsiinis. [1]

Hoolimata LC/ESI/MS meetodi ulatuslikust kasutamisest, pole kõik analüüsil toimuvad protsessid veel teada, kusjuures kõige suurem ebaselgus on ESI ioniseerumise mehhanismi osas. [2]

1.1. ESI allikas

ESI allikas ioniseeritakse ühendeid kahe elektroodi (ESI nõel ja MS-i sisend) vahele rakendatud pinge abil. Vastavalt elektroodidele rakendatud potentsiaali märgile eristatakse positiivset ning negatiivset ESI režiimi, millest esimene on levinum [3]. Käesolevas töös kasutatakse ainult positiivset režiimi ning seetõttu vaadeldakse edaspidi kogu ESI mehhanismi positiivse režiimi näitel. Antud olukorras on anoodiks ESI nõel ning katoodiks MS-i sisendkapillaar.

ESI allika ning seega ka käesoleva töö seisukohalt on oluline eristada mõisteid ioniseerumine ning protoneerumine. Protoneerumiseks nimetatakse analüüdi molekuli ioniseerumist lahuses prootoni liitumise teel. Ioniseerumise all peetakse silmas analüüdi molekulist gaasifaasiliste ionide tekkimist.

ESI allikas saab lahuses olevate ühendite üleminekut gaasifaasilisteks ionideks kirjeldada kolme põhietapina. Esimeses etapis moodustuvad ESI nõela tipus laetud tilgad. Teises etapis toimub tilga kontsentreerumine lahusti aurustumisel ning veel väiksemate tütartilkade eraldumine. Kolmandas etapis tekivad gaasifaasilised ioonid. [1]

Põhjalikumalt kirjeldades toimub esimene etapp nii, et proovilahus suunatakse ionisatsiooniallikasse läbi peene ESI nõela, mille otsale on rakendatud kõrgepinge. Elektrivälja toimel koonduvad positiivsed ioonid nõela tippu tekkiva vedelikukoonuse pinnale

ning negatiivsed ioonid suunatakse mööda nõela seina eemale ning neutraliseeritakse. Sellise elektroforeetilise liikumise eelduseks on piisav elektrolüütide sisaldus lahuses [4]. Pinge rakendamise tagajärjel tekib kapillaari tippu nn Tayloriga koonus, millest eralduvad laenguga tilgad sel hetkel, kui elektrostaatiline tõukumine ionide vahel ületab vedeliku pindpinevuse. [3, 5]

Esimeses etapis moodustunud laenguga tilgad liiguvad katoodi ehk negatiivselt laetud MS-i sisendkapillaari poole. Selle käigus põrkuvad tilgad allikast läbi voolava kuuma kuivatusgaasiga, mis viib lahusti aurustumise ning tilkade kontsentreerumiseni. Aurustumise käigus kasvab tilkade pinnal elektrostaatiline tõukumine, kuni ühel hetkel saab elektrostaatiline tõukumine võrdseks lahuse pindpinevusega. Kui see nn Rayleighi piir ületatakse, siis toimub kuloniline plahvatus, mille käigus tilk laguneb väiksemateks laetud tilkadeks (tütarilks). Kusjuures on leitud, et tütarilk sisaldab 2–5% esialgse tilga massist, kuid 15–25% laengust [1]. Protsess kordub, kuni tüartilgad on piisavalt väikesed, et saab toimuda ionide aurustumine tilgast. Selliseid enne iooni aurustumist tekkinud väikseid tilku kutsutakse laenguliiga nanotilkadeks. Seejuures on molekulaardünaamiliste (MD) meetoditega selgeks tehtud, et nanotilkade puhul on laenguliig alati koondunud tilga pinna lähedale. [1, 3, 5]

Kolmas ESI allikas toimuv etapp, gaasifaasiliste ionide tekkimine, ei ole siiani päris selge, ent välja on pakutud kolm teooriat: ioonaurustumise mudel, jääklaengute mudel ning ahela väljaheitmise mudel. [3]

Ioonaurustumise mudeliga [6] kirjeldatakse väikeste madala molaarmassiga ühendite ioniseerumist. Tavaliselt saab analüüt laengu lahuses toimuva protoneerumise käigus. Iribarne ja Thomson [7] on näidanud, et kui nanotilga aurustumisel tilga raadius väheneb alla 10 nm, siis on võimalik, et tilgast eralduvad gaasifaasilised ioonid. MD simulatsioonid on näidanud, et iooni lahtirebimisel tilgast on ioon esmalt seotud tilgaga nn lahustisillaga [2]. Silla katkemisel eraldub gaasifaasiline solvateeritud ioon, mis koosneb analüüdi ionist ja mõnest lahusti molekulist. Solvateeritud iooni teekonnal massispektromeetrisse lahustikiht aurustub ning alles jääb üksik gaasifaasiline ioon. Kirjeldatud silla tekkimise nähtus sõltub ka lahusti omadustest. Näiteks puhta vesikeskkonna puhul pole suure pindpinevuse tõttu seda nähtust täheldatud. [2, 3]

Teist, jääklaengute mudelit [8] kasutatakse suurtest globulaarsetest molekulidest gaasifaasiliste ionide tekkimise kujutamiseks. Seega on see peamine mudel valkude ionisatsiooni kirjeldamiseks. Mudel selgitab olukorda, kus nanotilk koosneb üksikust analüüdi molekulist,

lahustist ja laengukandjatest. Lahustikiht aurustub täielikult ning laengukandjad seostuvad analüüsitava molekuliga, tekitades gaasifaasilise iooni. [1, 3]

Ahela väljaheitmise mudel on välja pakutud selleks, et kujutada ebakorrapäraste ning osaliselt hüdrofoobsete polümeeride ioniseerumisprotsessi. Mudel selgitab ionisatsiooniprotsessi lühikese (hüdrofoobse) ahelaga polümeeride jaoks. Nanotilgas liigub selline hargnenud hüdrofoobne ahel tilga pinnale ning väljub sealt otsapidi gaasifaasi. Ahel liigub lülide kaupa järjest enam gaasifaasi, haarates endale tilga pinnalt laengu. Kui kogu ahel on tilgast lahkunud, ongi tekkinud gaasifaasiline polümeeriioon. [3]

Ioonaurustumise, jääklaengute ja ahela väljaheitmise mudel suudavad kirjeldada paljude erinevate analüütide käitumist ESI allikas kvalitatiivselt, kuid kvantitatiivselt ei osata ühtegi ionisatsiooniprotsessi veel ennustada. [3]

Lisaks nimetatud protsessidele on pakutud, et ioniseerumine võib toimuda ka gaasifaasiliste ioon-molekul reaktsioonide kaudu. Kuna ESI protsessi käigus võib lisaks analüüdile saada laengu ka lahusti, siis sõltuvalt molekulide prootonafiinsustest (PA) võib laetud lahusti põrkumisel analüüdi molekuliga toimuda ioniseerumine ka gaasifaasis. Positiivse režiimi puhul toimub gaasifaasiline ioniseerumine siis, kui analüüdi PA on kõrgem kui lahustil. Samas võib lahusti, mille PA on kõrgem kui analüüdil, ionisatsiooni ka maha suruda. [5]

1.2. Ionisatsiooniefektiivsus

Kvantitatiivsete analüüside eesmärgiks on määrata uuritava aine sisaldust proovis. ESI/MS meetodi puhul on selleks vaja teada, kui suur osa analüüdi molekulidest ioniseerub ning seeläbi massispektris signaali annab. Ühe analüüdi ioniseerunud molekulide arvu suhet kõigi selle analüüdi molekulide arvuga nimetatakse ionisatsiooniefektiivsuseks.

Võiks arvata, et lahuses toimuvat protoneerumist ning seega ka ionisatsiooniefektiivsust kirjeldab hästi dissotsiatsioonikonstant (K_a). Paraku on leitud [9, 10], et ionisatsiooniefektiivsus ei ole seotud analüüdi dissotsiatsioonikonstandiga alglahuses ning pole seega lihtsalt arvutatav. Vastupidi, ionisatsioon ESI protsessis on keerukas ning ionisatsiooniefektiivsust mõjutavad lisaks analüüdile ka mitmed lahusti ja lisandite omadused ning allika parameetrid. Näiteks mõjutavad ionisatsiooniefektiivsust lahusti lenduvus, pindpinevus ja pH ning lisandi kontsentratsioon [5]. Samuti on leitud seos ionisatsiooniefektiivsuse ja mitmete analüüdi omaduste vahel nagu pK_a [11], hüdrofoobsus [11], pindaktiivsus ja prootonafiinsus [5].

Ühese ionisatsiooniefektiivsuseid ennustava mudeli puudumise tõttu kasutatakse LC/MS analüüsil kvantitatiivsete tulemuste saamiseks kalibreerimisgraafiku meetodit, mida saab kasutada vaid ühenditele, mille jaoks on standardained olemas.

1.2.1. Lahusti mõju

ESI allikale sobivad lahustid on kõrge kuni keskmise polaarsusega. Vähepolarseid lahusteid kasutatakse harva, sest nad on väikese elektrijuhtivusega ning ei suuda seega ESI nõela otsas laenguid eraldada. Lahusti valikul tuleb silmas pidada ka viskoossust. Väga viskoossetes vedelikes on ionide elektroforeetiline liikuvus madal, mis samuti takistab Tayloriga koonuse tekkimist ning laengute eraldamist. [5]

Tekkinud ESI tilkade aurustumist mõjutavad lahusti pindpinevus ning lenduvus. Kõrge pindpinevusega lahustist nõela tipus tekkivad tilgad on suuremad, võrreldes madala pindpinevusega lahusti tekitatud tilkadest. Lahusti lenduvus määrab tilkade aurustumise kiiruse ning seega gaasifaasiliste ionide tekke ulatuse. Kõrge pindpinevuse ja madala lenduvuse tõttu on analüütidel vesikeskkonnas tavaliselt madalam signaal kui orgaanilistes lahustites. [5]

Kõige sagedamini kasutatakse ESI/MS meetodis lahustina vett, metanooli või atsetonitriili. Seejuures ei kasutata tihti ainult puhtaid ühe lahusti keskkondi, vaid teostatakse analüüsid erinevates vesi-orgaanika segudes. Kui ESI/MS meetodile eelneb vedelikkromatograafiline eraldamine, siis on oluline, et lahusti sobiks ka LC eluendiks.

Samas tuleb arvestada, et valitud lahusti või lahustite segu füüsiko-keemilised omadused muutuvad ESI protsessi käigus. Tilkade moodustumine ning lahusti aurustumine ESI tilkadest võivad erinevate lahustite puhul toimuda eri määral ning seega on raskendatud ka ionisatsiooniprotsessi ennustamine. ESI protsessi kirjeldamiseks on pihuses toimuvaid lahusti omaduste muutusi uuritud ning sellist iseloomustamist kutsutakse ESI pihuse profileerimiseks.

Näiteks on laserindutseeritud fluorestsentspektroskoopia abil [12, 13] näidatud, et ESI protsessi käigus muutub lahustisegude koostis. Selgub, et vesi-orgaanika segudes lendub tilga aurustumise käigus rohkem lenduvamat orgaanilist lahustit, muutes sellega tilga keskkonna kuni 20 protsendipunkti veerikkamaks, kui on esialgne lahusti. Samade tulemusteni on jõutud ka molekulaardünaamiliste simulatsioonidega [2].

Samuti on pihust profileerides näidatud [14], et ESI protsessi käigus muutub lahuse pH. Seejuures sõltub pH muutus nii lahuse polaarsusest kui ka tema algsest pH väärtusest. Van Berkel *et al.* [4] on leidnud, et pH muutus tilgas võib olla kuni 4 ühikut.

Profileerides on uuritud ka temperatuuri muutust ESI tilkades ning saadud väga vastakaid tulemusi. Gibson *et al.* [15] leidsid, et ESI nõelast eemaldudes võib pihuses olevate tilkade temperatuur langeda kuni 30 K. Samas Soleilhac *et al.* [16] näitasid, et tilga temperatuur ESI protsessi käigus hoopis kasvab umbes 10 K. Kuna happe dissotsiatsioonikonstandid on temperatuurist sõltuvad, siis ei ole temperatuurimuutuse tõttu teada ka analüütide täpsed pK_a väärtused ESI tilkades.

1.2.2. Lisandi mõju

ESI/MS lahustites kasutatakse ionisatsiooni parandamiseks erinevaid lisandeid ja puhvreid. Lisandite valikul peab arvestama nende lahustuvuse ja lenduvusega, et mitte saastada ionisatsiooniallikat [5]. Samuti ei tohi puhvri komponendid ise ESI allikas ioniseeruda.

Kindlasti on vajalik leida sobiv lisandi kontsentratsioon, et tagada analüüdi signaali kontsentratsioonist sõltuvuse lineaarsus. Liiga väike lisandi sisaldus ei pruugi anda parimat tundlikkust, samas aga liiga kõrge kontsentratsiooniga lisand võib analüütilise signaali maha suruda. [5]

Signaali võivad maha suruda ka mõned väga tugevalt happelised või kõrge pindaktiivsusega lisandid. Näiteks trifluoroäädikhappe (TFA) puhul on signaali mahasurumist täheldatud. Põhjus võib olla selles, et TFA-anioon moodustab analüüdi katiooniga ioonpaari ning seeläbi jõuab ioniseerunud analüüte gaasifaasi vähem. [5]

Teisalt on aga leitud [17], et ioniseerumist ESI allikas soodustab sipelghappe lisand.

Kõige enam kasutatakse ESI/MS mõõtmistel puhvri komponentidena sipelg- ja äädikhapet, nende ammooniumsoolasid ning ammooniaagi lahust. [5]

1.2.3. pH mõju

Sageli saadakse parim ESI signaal siis, kui analüüt protoneerub lahuses lisandi komponentide mõjul. Happelised analüüdid deprotoneeruvad siis, kui nende pK_a on lahuse pH väärtusest madalam ning aluselistele analüütidele protoneerumine toimub, kui nende happelise vormi pK_a on lahuse pH väärtusest kõrgem. See aga tähendab, et ühendi ioniseerumine peaks väga tugevasti sõltuma lahuse pH väärtusest. [5]

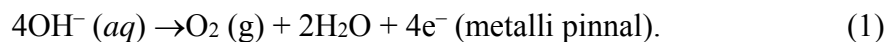
Samas on näidatud, et ESI nõela tipus toimuvate redoksreaktsioonide tõttu võib pH ESI tilkades erineda pH väärtusest esialgsest lahustis kuni 4 pH ühikut (ptk 1.2.1). Positiivses režiimis on tilkade pH madalam sisestatud lahusti pH väärtusest ning seega võivad mitmed analüüdid, mis lahuses olid neutraalsel kujul, protoneeruda alles ESI tilgas. [5]

Varem on pH mõju ionisatsiooniefektiivsusele küll uuritud, ent pH ja lisandi mõju pole eristatud. Neid efekte on keeruline eraldi uurida, sest pole olemas ühte lisandit, millest saaks valmistada lahuseid laias pH vahemikus.

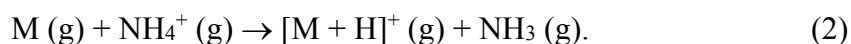
1.3. Pöörd-ESI

Pöörd-ESI (ingl *wrong-way-round ionization*) on nähtus, mille korral ühendite ionisatsiooniefektiivsus kasvab ootuspärasele vastupidiselt. Nii on täheldatud kõrget intensiivsust $[M + H]^+$ ioonidel tugevalt aluselises keskkonnas ning $[M - H]^-$ ioonidel tugevalt happelises keskkonnas [18]. Mõiste võtsid kasutusele Mansoori *et al.* [9], kes arendasid edasi Hiraoka *et al.* [10] uurimust aminohapete pH-sõltuvusest. Pöörd-ESI toimumiseks on pakutud mitut võimalust.

Ühe hüpoteesi järgi tõuseb pH aluselistes lahustes tänu ESI nõelas toimuvatele elektrokeemilistele protsessidele, mida kirjeldab võrrand 1:

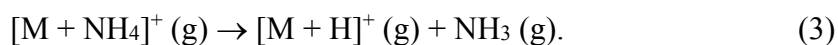


Teine hüpotees kirjeldab ioniseerumist gaasifaasilise prootoni ülekandena. See oletus pakuti välja Guevremont *et al.* [19] poolt, et kirjeldada ioniseerumist kõrgetel pH väärtustel lahustes, mis sisaldavad ammoonium- (või alküülammoonium)ioone. Hüpoteesi kirjeldab võrrand 2:

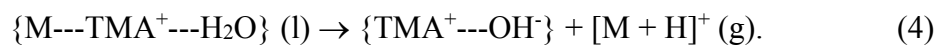


Viimastel aastatel on ka Yang *et al.* [20] uurinud ammoniaagi lahuse mõju gaasi- ning lahusefaasilisele protoneerumisele. Nad leidsid, et ammoniaagi lahuse lisamisel metanoolilahusele toimus gaasifaasiline protoneerumine, tõstes oluliselt analüütide ionisatsiooniefektiivsusi.

Samas võib ammooniumioon moodustada analüüdi molekuliga ka adukti, mis lagunemisel võib anda protoneeritud molekuli. Adukti lagunemist kirjeldab võrrand 3:



Kolmas versioon kirjeldab ioniseerumist sellistes lahustes, mille lisand pole lenduv ega sisalda prootonit, näiteks tetrametüülammoonium (TMA^+). TMA^+ puhul on pakutud välja lahuses toimuv pöörd-ESI mehhanism [9] vastavalt valemile 4:



Kuivõrd nimetatud kolm versiooni pakuti välja viimase sajandivahetuse paiku ning siiani pole pöörd-ESI kirjeldamiseks ühte universaalset mehhanismi leitud, on see valdkond, mida kindlasti tasub uurida.

2. MATERJALID, APARATUUR JA MEETODID

2.1. Kasutatud ained

Ionisatsiooniefektiivsused mõõdeti 10 analüüdile nii puhtas vesikeskkonnas kui puhtas metanoolis, varieerides lahuste koostist ning pH väärtust. Vesilahused valmistati Millipore veepuhastuseadmega (Milli-Q Advantage10) saadud ülipuhtast veest, mille eritakistus oli $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ning orgaanilise süsiniku üldsisaldus (TOC) $\leq 5 \text{ ppb}$. Metanoolilahused tehti HPLC puhtusega metanoolist (Sigma-Aldrich) ning nende Karl Fischeri tiitrimismeetodil mõõdetud veesisaldused jäid vahemikku 0,06% kuni 1%. Tetraetüülammooniumi ionisatsiooniefektiivsuse väärtuse leidmisel kasutati lahustina HPLC puhtusega atsetonitriili (Sigma-Aldrich).

Vees mõõdeti ionisatsiooniefektiivsusi 28-s erineva koostise ning pH väärtusega lahuses vahemikus $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 1,42 \dots 10,29$, metanoolis 14-s erineva koostise ning pH väärtusega lahuses vahemikus $\text{pH}^{\text{MeOH}} = 3,63 \dots 12,24$. Lahuste valmistamiseks kasutati järgmisi lisandeid: trifluoroäädikhape (Sigma-Aldrich), oblikhappe dihidraat (Lach:NER), sipelghape (Sigma-Aldrich), äädikhape (Sigma-Aldrich), sidrunhape (Fisher), ammooniumfluoriid (Sigma-Aldrich), ammooniumatsetaat (Sigma-Aldrich), ammooniumformiaat (Sigma-Aldrich), ammoniumhüdrosiid (Sigma-Aldrich) ja metüülamiin (Sigma-Aldrich). Kõik lisandid peale oblikhappe dihidraadi ja sidrunhappe olid LC/MS puhtusega. Kõikidest lisanditest valmistati 5 mM lahused ning oblikhappe dihidraadist lisaks ka 50 mM vesilahus, et laiendada mõõtmisala madala $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ suunas. Mitmest lisandist koosneva lahuse saamiseks segati 5 mM lahuseid sellises vahekorras, et saada soovitud pH.

Ankurainena kasutati ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmisel tetraetüülammoonium perklorati (Fluka), mille suhtes mõõdeti veel kümne analüüdi ionisatsiooniefektiivsused. Need analüüdid olid *N,N*-dimetüülaniin (Reakhim), 4-metoksü-*N,N*-dimetüülaniin (Sigma-Aldrich), kinoliin (Sigma-Aldrich), 2,6-diaminopüridiin (Sigma-Aldrich), 4-aminobensoehape (Sigma-Aldrich), 1-naftüülamiin (Reakhim), 2-amino-2(hüdroksümetüül)-1,3-propaandiool (Sigma-Aldrich), 2-aminofenool (Sigma-Aldrich), 4-metoksüaniin (Reakhim, ümberkristallitud vesi-etanool segus) ja 2-metüül-8-aminokinoliin (Reakhim). Kõikide ainete puhtused olid kontrollitud massispektromeetriga. Ainete struktuurvalemid ja füsiko-keemilised omadused on toodud lisas (Lisa 1).

Metanoolilahuste kalibreerimiseks kasutati oblikhappe dihidraati (Lach:Ner), ammoniumoksalaati (Reakhim), salitsüülhapet (Reakhim) ja naatriumsalitsülaati (Reakhim).

UV-Vis spektrofotomeetriliste mõõtmiste ning lahuste pH temperatuurist sõltuvuse uurimise jaoks kasutati äädikhapet (Fisher), naatriumatsetaati (Reakhim), naatriumtetraboraati (Reakhim), dinaatriumvesinikfosfaati (Fisher), kaaliumdivesinikfosfaati (Fisher) ning kaaliumdivesiniktsitraati (Reakhim).

2.2. Aparatuur

Ionisatsiooniefektiivsusi mõõdeti Agilent Technologies kolmekordse kvadрупooliga (3Q) massispektromeetril (6495 Triple Quad LC/MS) positiivses režiimis, kasutades ESI (Agilent Jet Stream) allikat. Mõõtmistel kasutatud ESI parameetrid olid: kapillaaripinge 3000 V, pihustusgaasi rõhk 20 psi, kuivatusgaasi voolukiirus 12 l/min, kuivatusgaasi temperatuur 200 °C, kardingaasi voolukiirus 11 l/min ja kardingaasi temperatuur 250 °C.

Kontroll-mõõtmised veefaasis teostati Agilent Technologiesioonlõksuga massispektromeetril (LC/MSD Trap XCT) samuti positiivses režiimis, kasutades ESI allikat, mille parameetrid olid: kapillaaripinge 3500 V, pihustusgaasi rõhk 50 psi, kuivatusgaasi voolukiirus 10 l/min, kuivatusgaasi temperatuur 350 °C.

Analüütide $pK_a^{H_2O}$ väärtused 50 °C juures mõõdeti Evolution 300 UV-Vis spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific) kasutades kvartsküvette ning termostaati. pH-meetri kalibreerimiseks kasutati nelja lahuse (ptk 2.1) teadaolevaid pH väärtusi 50 °C juures [21].

Nii vesilahuste kui ka metanoolilahuste pH mõõtmiseks kasutati klaaselektroodi (Oakton-WD-35801-00) ning pH-meetrit (Evikon E6115). Lahuste valmistamisel kasutati analüütilist kaalu (Sartorius LA230S) ning automaatpipette (Eppendorf Research plus).

2.3. Meetodid

Absoluutsel meetodil on ionisatsiooniefektiivsuste määramine väga keeruline [22] ning seetõttu kasutati selles töös suhtelist meetodit.

Ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmiseks valmistati analüütidest standardlahused, mille kontsentratsioonid jäid vahemikku 10–122 µM. Nimetatud standardlahused segati lahustiga massispektromeetri automaatse proovisisestussüsteemi abil ning süstiti massispektromeetrisse

viiel erineval kontsentratsioonil. Lahuste kontsentratsioonid, mida massispektromeetrisse süstiti, olid vahemikus 0,1 kuni 4,1 μM sõltuvalt ainekogusest ja lahjendusest.

Saadud tulemustest koostati iga analüüdi jaoks kalibreerimisgraafik telgedes analüütiline signaal vs. lahuse kontsentratsioon ning ionisatsiooniefektiivsuste leidmiseks kasutati valemit 5 [23]:

$$\log IE(M) = \log\left(\frac{t_{\text{õus}}([M+H]^+)}{t_{\text{õus}}(\text{Et}_4\text{N}^+)} \times \frac{IC(M)}{IC(\text{Et}_4\text{N}^+)}\right) + \log IE(\text{Et}_4\text{N}^+). \quad (5)$$

Valemis toodud M tähistab analüüti ning Et_4N^+ tetraetüülammooniumit. Valem arvestab ka ainete isotoopjaotust (IC). Tetraetüülammoonium oli töös ankuraineiks. Kõik mõõtmised teostati just selle aine suhtes, sest tetraetüülammooniumi ionisatsiooniefektiivsus on lahuse pH väärtusest sõltumatu [24].

Tetraetüülammooniumi ionisatsiooniefektiivsuse väärtused vees ja metanoolis saadi keskmistades kahel instrumendil ning kahel meetodil mõõdetud tulemustest. Kolmekordse kvadрупooliga seadmel arvutati ionisatsiooniefektiivsus kahe lahusti vahelise tõusude suhte meetodil ningioonlõksuga massispektromeetril infuseerimisel saadud tulemustest. Mõlemal juhul võeti referentsväärtuseks 4,16, mis on varem leitud tetraetüülammooniumi ionisatsiooniefektiivsuse väärtus atsetonitriili ja 0,1% sipelghappe 80:20 segus [24]. Tõusude suhte meetodi puhul kasutati valemit 6:

$$\log IE(L_n) = 4,16 + \log\left(\frac{t_{\text{õus}_{L_n}}}{t_{\text{õus}_{AN}}}\right), \quad (6)$$

kus $\log IE(L_n)$ tähistab tetraetüülammooniumi ionisatsiooniefektiivsust uuritavas lahustis, $t_{\text{õus}_{L_n}}$ tetraetüülammooniumi kalibreerimisgraafiku tõusu uuritavas lahustis ning $t_{\text{õus}_{AN}}$ tetraetüülammooniumi tõusu atsetonitriili ja 0,1 % sipelghappe 80:20 segus. Infuseerides kasutati analoogset valemit, kus tõusude asemel kasutati signaalide suhet kontsentratsioonidesse. Tetraetüülammooniumi ionisatsiooniefektiivsuse väärtuseks vees saadi 3,86 ning metanoolis 4,35.

UV-Vis spektrofotomeetriliste mõõtmiste ning lahuste pH temperatuurist sõltuvuse uurimise jaoks kasutati nelja kalibreerimislahust. Need lahused olid 100 mM äädikhappe ja 100 mM naatriumatsetaadi lahus, 0,01 m naatriumtetraboraadi lahus, 0,025 m dinaatriumvesinikfosfaadi ja 0,025 kaaliumdivesinikfosfaadi lahus ning 0,05 m kaaliumdivesiniktsitraadi lahus. [21]

Analüütide $pK_a^{H_2O}$ väärtused 50 °C juures leiti spektrofotomeetrilisel meetodil. Selleks mõõdeti analüütide neutraalsete ja protoneeritud vormide spektrid erinevate pH väärtustega lahustes ning $pK_a^{H_2O}$ väärtuste arvutamiseks kasutati valemit 7:

$$pK_a = -\log \left[\left(\frac{A - A_{AH^+}}{A_A - A} \right) \times [H^+] \right], \quad (7)$$

kus $[H^+]$ tähistab vesinikioonide kontsentratsiooni, A_{AH^+} tähistab neeldumist kindlal lainepikkusel sellise pH väärtusega lahuses, kus analüüt on täielikult protoneeritud, A_A tähistab neeldumist kindlal lainepikkusel sellise pH väärtusega lahuses, kus analüüt on täielikult neutraalses vormis ning A tähistab neeldumist kindlal lainepikkusel suvalise pH väärtusega lahuses, kus analüüt esineb nii protoneeritud kui ka neutraalsel kujul.

Metanoolilahuste pH^{MeOH} mõõtmiseks valmistati täpsetel kontsentratsioonidel kaks kalibreerimislahust metanoolis, mille pH^{MeOH} väärtused olid teada. Üks kalibreerimislahus valmistati 10 mM oblikhappe dihidraadist ja 10 mM ammooniumoksalaadist ning teine 10 mM salitsüülhapest ja 10 mM naatriumsalitsülaadist. Saadud lahuste pH^{MeOH} väärtused olid vastavalt 5,8 ja 7,5. [25]

2.4. Arvutused

Igale analüüdile leiti Molinspiration kalkulaatoriga [26] $\log P$ ning ACE ja JChem happelisuse-aluselise kalkulaatoriga [27] $pK_a^{H_2O}$ väärtused. Samuti leiti kirjandusest ning andmebaasidest analüütide pK_a^{MeOH} väärtused [28] ning PA väärtused [29].

Ionisatsiooniefektiivsuste kokkulangevusi kontrolliti t -testiga 95% usaldusnivool, kasutades valemeid 8 ja 9 [30]:

$$s^2 = \frac{(n_1-1) \times s_1^2 + (n_2-1) \times s_2^2}{(n_1+n_2-2)} \quad (8)$$

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}. \quad (9)$$

3. TULEMUSED

3.1. Ionisatsiooniefektiivsuse uurimine vees ja metanoolis

Töö eesmärgiks oli uurida, kuidas lahuse pH ning lisandid mõjutavad ionisatsiooniefektiivsust ESI allikas. Selleks mõõdeti analüütide ionisatsiooniefektiivsusi 28 erineva koostise ja pH väärtusega vesilahuses. Uuritud $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ vahemikuks oli 1,42 kuni 10,29. Samuti mõõdeti analüütide ionisatsiooniefektiivsusi 14 erineva koostise ja pH väärtusega metanoolilahuses, kus uuritud pH^{MeOH} vahemikuks oli 3,63 kuni 12,24.

Kõikide lahustega tehti vähemalt 2 kordusmõõtmist. Tulemuste kooskõllalisust hinnati kogutud standardhälbega s , mis jäi vesilahustes vahemikku 0,07 kuni 0,37. Seejuures oli vesilahustest kõige parem kooskõla 50 mM oblikhappe lahuses ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 1,42$) ning kõige kehvem 1 mM ammoniaagi lahuses ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 9,37$). Metanoolilahustes jäi kogutud standardhälve vahemikku 0,08 kuni 0,21. Seejuures oli metanoolilahustest kõige parem kooskõla 5 mM oblikhappe lahuses ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 4,10$) ning kõige kehvem 5 mM sipelghappe ja ammooniumatsetaadi puhverlahuses ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 6,30$).

Ionisatsiooniefektiivsusi prooviti mõõta ka ilma lisandita puhtas vees, kuid kordusmõõtmistel saadud tulemused olid ebausaldusväärsed ning mittekorduvad.

Mõõtmised viidi läbi 10 aluselise analüüdiga, mille $\text{pK}_a^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtused olid vahemikus 2,7 kuni 9,0 [27] ning teadaolevad $\text{pK}_a^{\text{MeOH}}$ väärtused vahemikus 5,16 kuni 10,25 [28]. Analüütide oktanool-vesi jaotumist kirjeldavad $\log P$ väärtused olid vahemikus -2,12 kuni 2,58 [26] ning teadaolevad PA -d vahemikus 864,7 kuni 953,2 kJ/mol [29]. Kõik ionisatsiooniefektiivsused mõõdeti suhtelisel meetodil. Ankurainena kasutati tetraetüülammooniumit, mille ionisatsiooniefektiivsuse väärtus mõõdeti peatükis 2.3 kirjeldatud meetodil. Vesilahuses saadi tetraetüülammooniumi ionisatsiooniefektiivsuse väärtuseks 3,86 ning metanoolis 4,35. Analüütidele mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused vesilahustes on toodud tabelis 1 ja metanoolilahustes mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused on toodud tabelis 2.

Kõige kõrgem mõõdetud ionisatsiooniefektiivsus ($\log IE = 4,34$) vees oli 2-metüül-8-aminokiniinil 5 mM sidrunhappe lahuses ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 2,47$). Kõige madalam ionisatsiooniefektiivsus ($\log IE = 0,43$) vees oli kinoliinil 5 mM sipelghappe ja ammooniumformiaadi puhverlahuses ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 5,00$). Kõige suurem ionisatsiooniefektiivsuse muutus ($\Delta \log IE = 2,67$) vees uuritud pH vahemikus oli kinoliinil 5 mM sidrunhappe

Tabel 1. Vesilahustes mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused

pH ^{H₂O}	Analüüt Koostis	N,N-dimetüülaniliin	4-metoksü-N,N-dimetüülaniliin	kinoliin	2,6-diaminopüridiin	4-aminobensoehape	1-naftüülamiin	2-amino-2-(hidroksimetüül)-1,3-propaandiool	2-aminofenool	4-metoksüaniliin	2-metüül-8-aminokinoliin	s
1,42	50 mM HOOC ¹ COOH	3,01	3,88	3,05	3,10	2,56	3,12	2,31	2,88	2,66	3,34	0,07
2,09	5 mM HOOC ¹ COOH	2,96	3,83	2,98	3,53	2,66	3,30	2,31	3,03	2,82	3,54	0,17
2,40	5 mM CF ₃ COOH	2,79	3,61	2,65	3,43	1,91	2,73	2,12	2,48	2,49	3,29	0,19
2,47	5 mM HOOC ¹ C(OH)(CH ₂ COOH) ₂	3,06	3,83	3,10	3,87	3,62	3,96	3,32	3,80	3,54	4,34	0,08
2,75	HOOC ¹ COOH ¹	2,82	3,68	2,78	3,52	2,44	2,95	1,95	3,04	3,21	3,55	0,22
2,79	5 mM HCOOH	2,50	3,58	2,51	3,40	2,73	3,12	2,41	3,04	3,07	3,68	0,31
3,00	5 mM HCOOH + CH ₃ COONH ₄	0,86	2,70	1,56	3,47	2,10	2,63	1,87	2,20	2,09	3,07	0,20
3,00	5 mM HCOOH + HCOONH ₄	0,70	2,75	1,43	3,59	1,94	2,02	1,69	2,08	1,84	2,86	0,14
3,08	1 mM HCOOH	1,60	3,62	2,57	3,56	2,68	3,13	2,35	3,22	3,49	3,53	0,35
3,15	5 mM CH ₃ COOH	1,58	3,67	2,94	3,78	3,01	3,65	2,95	3,52	3,35	4,22	0,14
3,25	5 mM HCOOH + CH ₃ COONH ₄	0,85	2,57	1,39	3,54	2,00	2,34	1,85	2,14	2,04	2,95	0,13
3,50	5 mM HCOOH + CH ₃ COONH ₄	0,81	2,23	1,26	3,37	1,92	2,11	1,62	2,08	1,81	2,67	0,24
3,67	0,1 mM HCOOH	1,18	3,54	2,24	3,43	2,60	3,11	2,32	3,25	3,50	3,47	0,21
4,00	5 mM HCOOH + CH ₃ COONH ₄	0,88	1,97	0,77	3,48	1,97	1,87	1,62	1,92	1,63	2,36	0,17
4,01	5 mM HCOOH + HCOONH ₄	0,92	2,00	0,74	3,54	1,73	1,56	1,42	1,92	1,50	2,48	0,16
5,00	5 mM HCOOH + HCOONH ₄	0,81	1,88	0,43	3,60	1,92	1,48	1,52	1,91	1,34	2,12	0,09
5,00	5 mM HCOOH + CH ₃ COONH ₄	0,84	1,57	0,63	3,50	1,90	1,57	1,74	1,85	1,27	1,94	0,22
5,52	5 mM NH ₄ F	1,29	2,12	1,19	3,83	2,67	1,83	2,43	1,94	1,66	2,58	0,16
5,90	5 mM HCOOH + CH ₃ COONH ₄	1,00	1,77	0,55	3,46	1,85	1,81	1,82	1,94	1,39	2,12	0,25
5,92	5 mM HCOOH + HCOONH ₄	1,07	1,81	0,68	3,44	2,07	1,71	1,73	2,02	1,46	2,30	0,17
6,60	1 mM CH ₃ COONH ₄	0,71	1,89	0,60	3,25	1,67	1,81	2,00	1,83	1,48	2,14	0,18
6,68	5 mM CH ₃ COONH ₄	1,09	1,94	0,66	3,38	1,79	1,86	2,13	2,05	1,50	2,20	0,21
6,77	10 mM CH ₃ COONH ₄	0,85	1,79	0,70	3,12	1,74	1,55	1,99	1,69	1,21	1,88	0,15
8,05	5 mM NH ₄ OH + CH ₃ COONH ₄	1,00	1,90	0,58	3,40	2,09	1,84	2,25	2,00	1,49	2,23	0,22
8,99	5 mM NH ₄ OH + CH ₃ COONH ₄	0,79	1,75	0,44	3,48	2,09	1,74	2,33	1,91	1,47	2,25	0,27
9,37	1 mM NH ₃	0,92	2,28	0,91	3,44	1,96	2,19	2,56	2,98	3,08	3,60	0,37
10,10	5 mM NH ₃	0,83	2,59	0,97	3,30	2,09	2,36	2,64	2,56	2,58	3,59	0,29
10,29	10 mM NH ₃	1,14	2,77	1,43	2,92	2,38	2,61	2,88	3,08	3,07	3,79	0,30

¹oblikhape – lahjendatud kuni pH^{H₂O} = 2,75

Tabel 2. Metanoolilahustes mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused

pH^{MeOH}	Analüüt Koostis	N,N -dimetüülaniliin	4-metoksü- N,N -dimetüülaniliin	kinoliin	2,6-diaminopüridiin	4-aminobensoehape	1-naftüülamiin	2-amino-2-(hüdroksumetüül)-1,3-propaandiool	2-aminofenool	4-metoksüaniliin	2-metüülkinoliin-8-amiin	s
3,63	5 mM CF_3COOH	3,64	3,98	3,63	4,05	2,60	4,29	2,56	3,64	3,72	4,60	0,18
4,10	5 mM HOOCCOOH	3,32	3,74	3,36	3,72	2,28	3,81	2,22	3,13	3,34	4,17	0,08
5,35	HOOCCOOH^1	3,05	3,55	3,00	3,42	0,67	3,43	1,76	2,80	3,00	4,05	0,12
5,40	5 mM HCOOH	2,77	3,15	2,65	3,27	1,50	3,46	1,84	2,83	3,09	3,68	0,18
5,90	1 mM HCOOH	2,56	3,20	2,41	3,25	0,80	3,38	1,72	2,80	3,02	3,54	0,14
6,10	5 mM $\text{HCOOH} + \text{CH}_3\text{COONH}_4$	2,56	3,33	2,86	3,62	1,42	3,24	1,10	2,46	2,69	4,07	0,10
6,30	5 mM $\text{HCOOH} + \text{CH}_3\text{COONH}_4$	2,72	3,20	2,72	3,43	1,24	3,12	1,57	2,54	2,73	3,91	0,21
6,48	5 mM CH_3COOH	2,34	2,76	2,09	3,17	0,87	2,80	2,01	2,56	2,83	3,44	0,18
6,64	0,1 mM HCOOH	2,55	3,45	2,75	3,34	0,70	3,52	1,84	2,95	3,20	3,92	0,14
7,60	5 mM $\text{HCOOH} + \text{CH}_3\text{COONH}_4$	1,65	2,28	1,74	3,42	0,94	2,47	1,50	1,95	2,13	3,03	0,09
8,40	5 mM $\text{HCOOH} + \text{CH}_3\text{COONH}_4$	1,34	2,13	1,57	3,75	1,09	2,33	1,62	2,09	2,07	2,95	0,16
9,36	5 mM NH_4F	1,20	2,14	1,46	3,35	1,16	1,98	1,94	1,60	1,82	2,82	0,08
10,10	5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$	1,29	2,10	1,63	3,11	0,86	2,19	1,67	1,94	1,96	2,99	0,19
12,24	5 mM NH_3	1,34	2,54	2,04	3,08	0,71	2,25	1,77	1,87	2,19	3,29	0,16

¹oblikhape – lahjendatud kuni $\text{pH}^{\text{MeOH}} = 5,35$

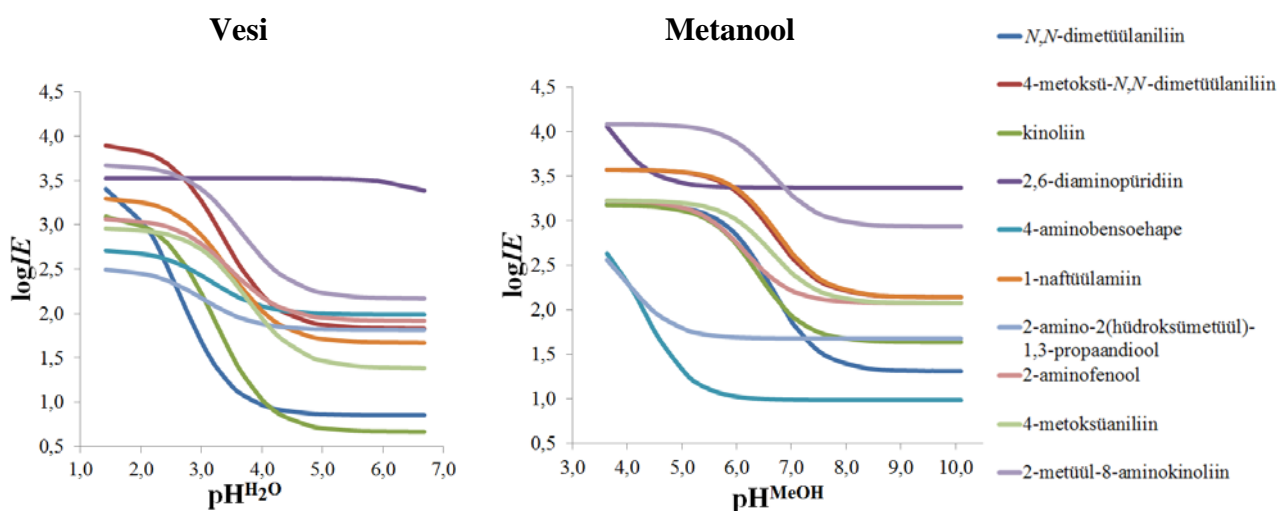
($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 2,47$) ja 5 mM sipelghappe ja ammooniumformiaadi puhverlahuse ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 5,00$) vahel. Samas kõige vähem muutus vees 2,6-diaminopüridiini ionisatsiooniefektiivsus ($\Delta\log IE = 0,95$) 5 mM sidrunhappe ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 2,47$) ja 10 mM ammoniaagi lahuse ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 10,29$) vahel.

Metanoolis oli kõige kõrgem mõõdetud ionisatsiooniefektiivsus ($\log IE = 4,60$) 2-metüül-8-aminokinoliinil 5 mM trifluoroäädikhappe lahuses ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 3,63$). Kõige madalam ionisatsiooniefektiivsus metanoolis ($\log IE = 0,67$) oli 4-aminobensoehappel oblikhappe lahuses ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 5,35$). Kõige suurem ionisatsiooniefektiivsuste muutus ($\Delta\log IE = 2,44$) metanoolis oli N,N -dimetüülaniliinil 5 mM trifluoroäädikhappe lahuse ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 3,63$) ja 5 mM ammooniumfluoriidi lahuse ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 9,36$) vahel. Kõige väiksem $\log IE$ väärtuste muutus ($\Delta\log IE = 0,97$) oli 2,6-diaminopüridiinil 5 mM trifluoroäädikhappe lahuse ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 3,63$) ja 5 mM ammoniaagi lahuse ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 12,24$) vahel.

Nii vees kui metanoolis mõõdetud ionisatsiooniefektiivsusi kasutades koostati Microsoft Exceli Solveri rakendusega sobitatud $\log IE$ vs. pH graafikud. Vees mõõdetud tulemuste sobitatud graafik koostati $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtuste vahemikus 1,42 kuni 6,68 ning metanoolis pH^{MeOH} väärtuste vahemikus 3,63 kuni 10,10. Kõikide ammoniaagi lahuste pH-punktid jäeti välja, sest seal oli märgata pöörd-ESI efekti (ptk-d 1.3 ja 3.2). Sobitatud graafikud koostati vastavalt tiitrimiskõverat iseloomustavale valemile 10:

$$\log IE = a \times \left(\frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_a} \right) + b. \quad (10)$$

Valemis märgib a ionisatsiooniefektiivsuste muutust graafiku hüppe alas, b graafiku alumise platoo ionisatsiooniefektiivsuse väärtust ning K_a sobitatud dissotsiatsioonikonstanti. Nii vee kui metanooli sobitatud graafikud on toodud joonisel 1 ning sobitatud graafikud koos mõõdetud punktidega igale analüüdile on toodud lisas (Lisa 2). Lisas 3 on esitatud sobitamisel saadud kordajate a , b ja $K_a^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtused nii vees kui metanoolis.



Joonis 1. Sobitatud graafikud vees ja metanoolis

Sobitamisel saadud kordajaid a , b ja $K_a^{\text{H}_2\text{O}}$ ning nende kombinatsioone korreleeriti analüütide parameetritega $\log P$, $\text{p}K_a^{\text{H}_2\text{O}}$, PA ja $\text{p}K_a^{\text{MeOH}}$. Parim korrelatsioon vees oli a ja PA vahel ($R^2 = 0,87$), kusjuures tõus oli positiivne. Teised kombinatsioonid ei andnud rahuldavaid seoseid ($R^2 < 0,6$). Metanoolis ei korreleerunud ükski ennustatud parameeter ei $\log P$, $\text{p}K_a^{\text{H}_2\text{O}}$, PA ega $\text{p}K_a^{\text{MeOH}}$ väärtustega rahuldavalt ($R^2 < 0,31$).

Varasemad uuringud [15, 16] on näidanud, et tilga temperatuur ESI allikas muutub, temperatuuriga muutub ka analüüdi $\text{p}K_a$ väärtus. Eeldades ESI tilga temperatuuri tõusu [16], määrati spektrofotomeetriliselt kolme analüüdi $\text{p}K_a^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtused 50 °C juures kontrollimaks,

kas sobitatud kõverate (joonis 1) hüppe asukoht võib olla seletatav temperatuuri tõusuga tilgas. Tulemused on toodud tabelis 3.

Samuti kontrolliti, kuidas muutub lahuse pH 50 °C juures ning leiti, et happelistes lahustes muutub pH minimaalselt ($\Delta\text{pH} = 0...0,11$), samas kui aluseliste lahustes võib lahuse pH 50 °C juures olla ligi 1 ühik madalam kui sama lahuse pH toatemperatuuril.

Tabel 3. Analüütide arvatud $\text{pK}_a^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtused [27], sobitamisel saadud $\text{pK}_a^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtused ning spektrofotomeetriliselt määratud $\text{pK}_a^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtused 50 °C juures

Analüüt	$\text{pK}_a^{\text{H}_2\text{O}}$ arvatud	$\text{pK}_a^{\text{H}_2\text{O}}$ sobitatud	$\text{pK}_a^{\text{H}_2\text{O}}$ 50 °C
kinoliin	4,90	3,24	4,40
1-naftüülamiin	3,90	3,45	3,49
2-metüül-8-aminokinoliin	4,70	3,64	4,33

Lisaks võrreldi mõlemas lahustis analüütide omavahelist ionisatsiooniefektiivsuste järjekorda erinevate lisanditega lahustes. Nii vesi- kui ka metanoolilahuste puhul selgus, et need analüüdid, mis on kõige kõrgema ionisatsiooniefektiivsusega happelistes lahustes, ei pruugi olla kõrgeima ionisatsiooniefektiivsusega aluselistes lahustes (joonis 1). Eelnevat kinnitas ka 5 mM sipelghappe lahuses mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuste korreleerimine 5 mM ammoniaagi lahuses mõõdetud ionisatsiooniefektiivsustega. Mõlemas lahustis olid korrelatsioonid kehvad: vees $R^2 = 0,56$ ning metanoolis $R^2 = 0,69$. Nimetatud korrelatsioonigraafikud nii vees kui metanoolis on toodud lisas (Lisa 4).

Analüütide suhtelisi ionisatsiooniefektiivsusi kindla lisandiga vesilahuses võrreldi ka sama lisandiga metanoolilahuse suhteliste ionisatsiooniefektiivsustega. Tuli välja, et need analüüdid, mis on kõrge ionisatsiooniefektiivsuse väärtusega 5 mM sipelghappe vesilahuses, ei pruugi seda olla 5 mM sipelghappe metanoolilahuses ning sama järeldus kehtib ka 5 mM ammoniaagi lahuste korral (joonis 1). Seda kinnitas ka metanoolis mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuste korreleerimine vees mõõdetud ionisatsiooniefektiivsustega. Mõlema lisandi puhul olid korrelatsioonid kehvad: 5 mM sipelghappe $R^2 = 0,55$ ning 5 mM ammoniaagi lahuse $R^2 = 0,43$. Nimetatud korrelatsioonigraafikud on toodud lisas (Lisa 5).

3.1.1. Ionisatsiooniefektiivsuste võrdlus kahel massispektromeetril

Ionisatsiooniefektiivsusi mõõdeti kolmekordse kvadрупooliga (3Q) massispektromeetril, mis oli ühendatud termilise fokuseerimisega ESI allikaga. Tulemuste kontrolliks mõõdeti samade analüütide ionisatsiooniefektiivsusi ka ioonlõks massispektromeetril, mis oli ühendatud

tavalise ESI allikaga. Kontroll-mõõtmised ioonlõksul teostati vesilahustes viiel $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtusel vahemikus 2,42 kuni 10,10. Saadud tulemused on toodud tabelis 4.

Masinatevahelise kokkulangevuse hindamiseks koostati igal $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtusel korrelatsioonigraafikud. Kahe masinaga saadud tulemuste korrelatsioon oli hea ($R^2 = 0,72 \dots 0,85$). Korrelatsioonigraafiku vabaliige oli statistiliselt oluliselt erinev nullist. Korrelatsioonigraafikud kahel instrumendil mõõdetud tulemuste vahel on toodud lisas (Lisa 6).

Tabel 4. Ionisatsiooniefektiivsuste võrdlus 3Q ja ioonlõks massispektromeetril

$\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$	Instrument	Analüüt Koostis	N,N -dimetüülaniliin	4-metoksü- N,N -dimetüülaniliin	kinoliin	2,6-diaminopüridiin	4-aminobensoehape	1-naftüülaniliin	2-amino-2-(hüdroksümetüül)-1,3-propaandiool	2-aminofenool	4-metoksüaniliin	2-metüül-8-aminokiniin	s
2,42	3Q	5 mM CF_3COOH	2,79	3,61	2,65	3,43	1,91	2,73	2,12	2,48	2,49	3,29	0,19
	ioonlõks		3,30	4,35	3,10	3,62	2,64	3,28	2,89	3,11	3,61	4,11	0,41
2,79	3Q	5 mM HCOOH	1,60	3,62	2,57	3,56	2,68	3,13	2,35	3,22	3,49	3,53	0,35
	ioonlõks		2,79	3,74	2,96	3,42	3,07	3,51	2,90	3,22	3,30	3,92	0,22
3,00	3Q	5 mM-d $\text{HCOOH} + \text{CH}_3\text{COONH}_4$	0,86	2,70	1,56	3,47	2,10	2,63	1,87	2,20	2,09	3,07	0,20
	ioonlõks		0,82	3,82	2,21	3,77	2,97	2,73	2,71	2,88	3,53	3,92	0,27
6,68	3Q	5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$	1,09	1,94	0,66	3,38	1,79	1,86	2,13	2,05	1,50	2,20	0,21
	ioonlõks		1,59	3,26	1,32	3,28	2,36	2,08	2,40	2,48	2,20	2,56	0,39
7,90	ioonlõks	1 mM CH_3NH_2	0,86	2,67	1,48	3,00	— ¹	1,08	2,52	1,66	2,06	3,35	0,28
10,10	3Q	5 mM NH_4OH	0,83	2,59	0,97	3,30	2,09	2,36	2,64	2,56	2,58	3,59	0,29
	ioonlõks		1,11	3,51	2,28	3,56	2,80	2,89	3,23	2,87	3,19	3,95	0,25

¹ – tundlikkus ei olnud mõõtmisteks piisav

3.2. Pöörd-ESI nähtuse uurimine

Kõrgetel pH väärtustel läbi viidud katsete tulemustest oli näha, et ionisatsiooniefektiivsus muutus vastupidiselt ootustele. Nimelt tõusis uuritud aluseliste analüütide ionisatsiooniefektiivsus ammoniaagi lahustes. Sellist nähtust on ka varem märgatud ning nimetatud pöörd-ESI ionisatsiooniks [9].

Pöörd-ESI nähtuse kinnitamiseks võrreldi 5 mM ammoniaagi lahuses mõõdetud ionisatsiooni-eefektiivsusi talle eelnevas pH-punktis mõõdetud ionisatsiooniefektiivsustega. Vees võrreldi seega 5 mM ammoniaagi lahuse ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 10,10$) ning 5 mM ammooniumatsetaadi ja

ammoniaagi puhverlahuse ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 8,99$) ionisatsiooniefektiivsusi ning metanoolis 5 mM ammoniaagi lahuse ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 12,24$) ning 5 mM ammooniumatsetaadi ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 10,10$) ionisatsiooniefektiivsusi. Võib öelda, et kõikidel analüütidel, mille kahe võrreldud pH-punkti ionisatsiooniefektiivsused on statistiliselt erinevad, esineb pöörd-ESI nähtus.

Tulemustest selgub, et vees on statistiliselt kõrgem ionisatsiooniefektiivsus 5 mM ammoniaagi lahuses võrreldes $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtusel 8,99 mõõdetud tulemustega kuuel analüüdil: 4-metoksü-*N,N*-dimetüülaniiliinil ($\Delta\log IE = 0,84$), 2-aminofenoolil ($\Delta\log IE = 0,65$), 4-metoksüaniiliinil ($\Delta\log IE = 1,11$), kinoliinil ($\Delta\log IE = 0,52$), 1-naftüülamiinil ($\Delta\log IE = 0,62$) ja 2-metüül-8-aminokinoliinil ($\Delta\log IE = 1,34$). Visuaalselt oli $\log IE$ vs. $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ graafikult näha ka 2-amino-2(hüdroksümetüül)-1,3-propaandiooli ionisatsiooniefektiivsuse tõus kõrgetel pH väärtustel, ent 5 mM ammoniaagi lahuses ning $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtusel 8,99 mõõdetud tulemused statistiliselt omavahel ei erinenud. Samas oli selle analüüdi puhul erandlikult märgata ionsatsiooniefektiivsuse tõusu juba alates 1 mM ammooniumatsetaadi lahusest ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 6,10$), mis erines 5 mM ammoniaagi lahusest ka statistiliselt ($\Delta\log IE = 0,64$).

Metanoolis esineb *t*-testi järgi pöörd-ESI nähtust ainult kinoliinil ($\Delta\log IE = 0,42$). Samuti oli visuaalselt aimata pöörd-ESI nähtust 4-metoksü-*N,N*-dimetüülkinoliinil ($\Delta\log IE = 0,44$), 4-metoksüaniiliinil ($\Delta\log IE = 0,24$) ja 2-metüül-8-aminokinoliinil ($\Delta\log IE = 0,30$), kuid nende puhul ei esinenud 5 mM ammoniaagi lahuse ning 5 mM ammooniumatsetaadi lahuse tulemustes statistilist erinevust.

Pöörd-ESI üks hüpotees kirjeldab protoneerumist läbi esialgselt moodustuva ammooniumadukti lagunemise (võrrandid 1 ja 2). Seda hüpoteesi kontrolliti kolmel erineval moel.

Esiteks valmistati vees kolmel erineval ammoniaagi kontsentratsioonil (1 mM, 5 mM ja 10 mM) lahused, et uurida, kas ionisatsiooniefektiivsus sõltub ammooniumiooni kogusest lahuses. Ammoniaagi erineva kontsentratsiooniga lahustes mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused on toodud tabelis 1. Enamike analüütide 1 mM, 5 mM ja 10 mM ammoniaagi lahustes mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused ei erine üksteisest statistiliselt. Statistiliselt oluliselt erines vaid 2-aminofenooli ionisatsiooniefektiivsus 1 mM lahuses võrreldes 5 mM lahusega.

Teiseks uuriti ammooniumaduktide võimalikku teket massispektritest. Uurides 5 mM ammoniaagi lahuses mõõdetud analüütide $[M + \text{NH}_4]^+$ ioone, oli neid näha vaid 4-metoksü-*N,N*-dimetüülaniliinil ning 2-metüül-8-aminokinoliinil.

Kolmandaks prooviti pöörd-ESI hüpoteesi kontrollida ka teise lisandiga. Mõõtmised viidi läbi 1 mM metüülamiini lahuses ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 7,90$)ioonlõks massispektromeetril. Paaegu kõikide analüütide ionisatsiooniefektiivsused metüülamiini lahuses olid võrreldes 5 mM ammoniaagi lahuses mõõdetud ionisatsiooniefektiivsustega statistiliselt olulisel määral madalamad. Ainult *N,N*-dimetüülaniliini ionisatsiooniefektiivsus ei olnud metüülamiini lahuses statistiliselt olulisel määral madalam ($\Delta\log IE = 0,24$) võrreldes ammoniaagi lahusega.

3.3. Lisandi koostise mõju uurimine

Mõõtmiste tulemuste põhjal koostatud $\log IE$ vs. pH graafikutelt oli näha, et ionisatsiooni-efektiivsus ESI allikas ei sõltu üksnes lahuse pH väärtusest. Graafikutelt tundus, et pH-efektis olulisem nii vees kui ka metanoolis oli lisandi koostise ning ka lisandi koostises oleva vastasiooni mõju.

Lisandi koostise mõju uurimiseks võrreldi *t*-testiga mitme erineva koostise, kuid sama või lähedase pH väärtusega lahustes saadud ionisatsiooniefektiivsusi nii vees kui metanoolis.

Esiteks võrreldi oblikhappe ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 2,75$) ning 5 mM sipelghappe ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 2,79$) ionisatsiooniefektiivsusi vees ning leiti, et mitte ühegi analüüdi ionisatsiooniefektiivsused pole oblikhappe lahuses võrreldes sipelghappe lahusega statistiliselt erinevad.

Samade lisandite vahelist kokkulangevust vaadeldi ka metanoolis. Oblikhappe ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 5,35$) ning 5 mM sipelghappe ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 5,40$) metanoolilahustes mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused ei läinud nii hästi kokku. Võrreldes 5 mM sipelghappe lahusega olid oblikhappe lahuses statistiliselt kõrgemad ionisatsiooniefektiivsused 4-metoksü-*N,N*-dimetüülaniliinil ($\Delta\log IE = 0,41$) ja kinoliinil ($\Delta\log IE = 0,35$). Statistiliselt madalam tulemus oblikhappe lahuses oli 4-aminobensoehappel ($\Delta\log IE = -0,83$).

Teiseks võrreldi 0,1 mM ja 1 mM sipelghappe lahuse ionisatsiooniefektiivsusi neile lähedastel pH väärtustel teistest lisanditest valmistatud lahuste ionisatsiooniefektiivsustega nii vees kui metanoolis.

Vees vaadeldi 0,1 mM sipelghappe lahuse ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 3,67$) ionisatsiooniefektiivsusi võrreldes 5 mM sipelghappe ja ammooniumatsetaadi puhverlahuste ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtustel 3,50 ja 4,00) ionisatsiooniefektiivsustega. 0,1 mM sipelghappe lahuses olid ionisatsiooniefektiivsused

võrreldes puhverlahuste ionisatsiooniefektiivsustega statistiliselt oluliselt kõrgemad ($\Delta\log IE = 0,66 \dots 1,79$) kõikidel analüütidel peale *N,N*-dimetüülaniliini ($\Delta\log IE = 0,33$) ning 2,6-dimetüülaniliini ($\Delta\log IE = 0,01$). 1 mM sipelghappe lahuse ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 3,08$) ionisatsiooniefektiivsusi võrreldi samuti 5 mM sipelghappe ja ammooniumatsetaadi puhverlahuste ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtustel 3,00 ja 3,25) ionisatsiooniefektiivsustega. Ka 1 mM sipelghappe lahuses olid ionisatsiooniefektiivsused võrreldes puhverlahustega statistiliselt oluliselt kõrgemad ($\Delta\log IE = 0,52 \dots 1,43$) enamike analüütide puhul. Statistiliselt ei erinenenud *N,N*-dimetüülaniliini ($\Delta\log IE = 0,75$), 2,6-dimetüülaniliini ($\Delta\log IE = 0,06$) ja 2-amino-2(hüdroksümetüül)-1,3-propaandiooli ($\Delta\log IE = 0,49$) ionisatsiooniefektiivsused.

Metanoolis võrreldi sama katse raames 0,1 mM sipelghappe lahuse ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 6,64$) ionisatsiooniefektiivsusi 5 mM sipelghappe ja ammooniumatsetaadi puhvri ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 6,30$) ionisatsiooniefektiivsustega. Statistiliselt erinev ionisatsiooniefektiivsus neis lahustes oli vaid 2-amino-2(hüdroksümetüül)-1,3-propaandioolil ($\Delta\log IE = 0,27$). 1 mM sipelghappe metanoolilahuse ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 5,90$) ionisatsiooniefektiivsusi võrreldi 5 mM sipelghappe ja ammooniumatsetaadi puhverlahuse ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 6,10$) ionisatsiooniefektiivsustega. Statistiliselt erinevad ionisatsiooniefektiivsused nende lahuste vahel olid kinoliinil ($\Delta\log IE = 0,45$), 4-aminobensoehappel ($\Delta\log IE = 0,63$) ja 2-metüül-8-aminokinoliinil ($\Delta\log IE = 0,54$). Lisaks oli katsest näha, et metanoolis ei olnud lahusti mõju kõikidele analüütidele ühesugune. Osade analüütide puhul oli ionisatsioon sipelghappe lahuses suurem ning teiste puhul madalam kui puhverlahustes.

Kolmandaks võrreldi 5 mM äädikhappe lahuse ionisatsiooniefektiivsusi talle lähedastel pH väärtustel teiste lisanditega lahustes mõõdetud ionisatsiooniefektiivsustega. Vees võrreldi 5 mM äädikhappe lahuse ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 3,15$) ionisatsiooniefektiivsusi 5 mM sipelghappe ja ammooniumatsetaadi puhverlahustes ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtustel 3,00 ja 3,25) saadud tulemustega. Kõigi analüütide puhul oli ionisatsiooniefektiivsus äädikhappes statistiliselt oluliselt kõrgem ($\Delta\log IE = 0,27 \dots 1,47$) kui lähedaste pH väärtustega puhverlahustes.

Metanoolis võrreldi 5 mM äädikhappe ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 6,48$) tulemusi 5 mM sipelghappe ja ammooniumatsetaadi puhvris ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 6,30$) mõõdetud ionisatsiooniefektiivsustega. Selgus, et äädikhappe ionisatsiooniefektiivsused olid statistiliselt olulisel määral madalamad võrreldes puhverlahusega kinoliinil ($\Delta\log IE = -0,63$) ning 2-metüül-8-aminokinoliinil ($\Delta\log IE = -0,47$). Samas ei olnud metanoolis 5 mM äädikhappe puhul piisavalt lähedasel pH väärtusel punkti, millega ionisatsiooniefektiivsusi võrrelda. Kuna just selles pH piirkonnas

võib metanoolilahustes ionisatsiooniefektiivsuste hüpe toimuda, siis ei pruugigi tulemused pH^{MeOH} väärtuste 6,48 ning 6,30 vahel võrreldavad olla. Tasuks teha täiendavaid mõõtmisi muu lisandiga lahuses, mille pH^{MeOH} on 5 mM äädikhappe lahusele lähem.

3.3.1. Lisandi koostises oleva vastasiooni mõju uurimine

Lisandi koostises oleva vastasiooni mõju uurimiseks mõõdeti nii vees kui ka metanoolis ionisatsiooniefektiivsus sama katiooni, kuid erineva vastasiooniga lisandite jaoks sama või lähedase pH väärtusega lahustes.

Vees valmistati lahused neljal lähedasel pH väärtusel nii 5 mM sipelghappe ja ammooniumatsetaadi puhvrist ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtustel 3,00; 4,00; 5,00 ja 5,90) kui ka 5 mM sipelghappe ja ammooniumformiaadi puhvrist ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtustel 3,00; 4,01; 5,00 ja 5,92). Esimesel juhul on ESI tilgas vastasioonidena nii formiaat- kui atsetaatioone, teisel juhul ainult formiaatioone. Mõlema puhversüsteemi kõikidel loetletud pH väärtustel mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused on toodud tabelis 1. Enamik kahe puhversüsteemi tulemustest ei ole statistiliselt olulisel määral erinevad. Statistiliselt erinevad vaid 1-naftüülamiini ionisatsiooniefektiivsused nii ammooniumatsetaadist ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 3,00$) ja ammooniumformiaadist ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 3,00$) kui ka ammooniumatsetaadist ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 4,00$) ja ammooniumformiaadist ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 4,01$) valmistatud lahustes ning kinoliini ionisatsiooniefektiivsus ammooniumatsetaadist ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 5,00$) ja ammooniumformiaadist ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 5,00$) valmistatud lahustes.

Samas hinnati *t*-testiga ka ammooniumfluoriidi kokkulangevust nii vees kui ka metanoolis tema lähedastel pH väärtustel teistest lisanditest valmistatud lahuste ionisatsiooniefektiivsustega. Ammooniumfluoriidi vesilahuses ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 5,52$) olid ionisatsiooniefektiivsused võrreldes 5 mM sipelghappe ja ammooniumatsetaadi puhverlahustes ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtustel 5,00 ja 5,90) mõõdetud ionisatsiooniefektiivsustega statistiliselt oluliselt kõrgemad ($\Delta \log IE = 0,15 \dots 0,79$) seitsmel analüüdil. Need analüüdid olid 4-metoksü-*N,N*-dimetüülaniliin, kinoliin, 4-aminobensoehape, 1-naftüülamiin, 2-amino-2(hüdroksümetüül)-1,3-propaandiool, 4-metoksüaniliin ja 2-metüül-8-aminokinoliin.

Metanoolis ei olnud ühelgi analüüdil ionisatsiooniefektiivsus ammooniumfluoriidi lahuses ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 9,36$) statistiliselt kõrgem võrreldes 5 mM ammooniumatsetaadi ja ammoniaagi puhverlahuses ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 8,40$) või 5 mM ammoniaagi lahuses ($\text{pH}^{\text{MeOH}} = 10,10$) mõõdetud ionisatsiooniefektiivsustega.

3.4. Lisandi kontsentratsiooni mõju uurimine

Varasemates töödes [5] on leitud, et lisandi kontsentratsioon lahuses on väga oluline, sest sellest sõltub kas ja kui palju lisand ioniseerumist soodustab või maha surub. Ka käesolevas töös uuriti lisandi kontsentratsiooni mõju mitmel moel.

Esiteks tehti lisandi kontsentratsiooni mõju uurimiseks katsed vees kolmel erineval ammooniumatsetaadi kontsentratsioonil (1 mM, 5 mM ja 10 mM). Ammooniumatsetaadi pH ei muutunud sellises kontsentratsioonide vahemikus oluliselt ning seega saab hinnata lisandi kontsentratsiooni mõju sõltumata lahuse pH väärtusest. Tulemused on toodud tabelis 1.

Enamike analüütide ionisatsiooniefektiivsused neil kolmel ammooniumatsetaadi kontsentratsioonil ei erinenud üksteisest statistiliselt olulisel määral. Statistiliselt madalam ($\Delta \log IE = -0,38$) oli ionisatsiooniefektiivsus 1 mM ammooniumatsetaadi lahuses võrreldes 5 mM lahusega vaid *N,N*-dimetüülaniliinil. 10 mM ammooniumatsetaadi lahuses oli statistiliselt madalam ionisatsiooniefektiivsus võrreldes 5 mM lahusega 1-naftüülamiinil ($\Delta \log IE = -0,26$), 4-metoksüaniliinil ($\Delta \log IE = -0,27$) ja 2-metüül-8-aminokiniinil ($\Delta \log IE = -0,26$).

Teiseks tehti lisandi kontsentratsiooni mõju uurimiseks katsed kolmel erineval sipelghappe kontsentratsioonil (0,1 mM, 1 mM ja 5 mM) nii vees kui metanoolis. Saadud tulemused on toodud tabelites 1 ning 2.

Ehkki vees muutub sellistel kontsentratsioonidel valmistatud sipelghappe $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ 0,88 ühikut, ei olnud tulemustes olulist statistilist erinevust. Ainsana oli *N,N*-dimetüülaniliini ionisatsiooniefektiivsus statistiliselt kõrgem 5 mM sipelghappe lahuses võrreldes nii 0,1 mM sipelghappe lahusega ($\Delta \log IE = 1,33$) kui ka 1 mM sipelghappe lahusega ($\Delta \log IE = 0,91$).

Metanoolis muutub pH^{MeOH} 5 mM ja 0,1 mM sipelghappe lahuse vahel 1,24 ühikut, kuid ka neis lahustes ei erinenud ionisatsiooniefektiivsused omavahel statistiliselt olulisel määral. Statistiliselt kõrgemad olid vaid 4-aminobensoehappe ionisatsiooniefektiivsused 5 mM sipelghappe lahuses võrreldes nii 0,1 mM sipelghappe lahusega ($\Delta \log IE = 0,81$) kui ka 1 mM sipelghappe lahusega ($\Delta \log IE = 0,71$).

Kolmandaks uuriti, kuidas mõjutab vees ionisatsiooniefektiivsust 50 mM oblikhappe lahus võrreldes 5 mM oblikhappe lahusega. Eeldati, et kõrgetel kontsentratsioonidel võivad oblikhappe anioonid tilgas analüütidega ioonpaare moodustada ning seeläbi ionisatsiooni maha suruda (ptk 1.2.2). Seetõttu kontrolliti tulemuste kokkulangevust ühepoolse *t*-testiga. Selgus,

et statistiliselt oluline ionisatsiooniefektiivsuse langus 50 mM oblikhappe puhul võrreldes 5 mM oblikhappega esines vaid 2,6-diaminopüridiiniil ($\Delta \log IE = -0,43$) ja 1-naftüülamiiniil ($\Delta \log IE = -0,90$).

4. TULEMUSTE ARUTELU

4.1. Ionisatsiooniefektiivsuse uurimine vees ja metanoolis

Ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmisel saadud korduvus nii vees kui metanoolis oli väga hea ($s = 0,07 \dots 0,37$). Kõige paremad korduvused olid happelistes lahustes ilmselt seetõttu, et neis lahustes olid ionisatsiooniefektiivsused kõigil analüütidel kõrged. Samas oli kõrgetel pH väärtustel mõne analüüdi tundlikkus madalam ning seetõttu ei saadud nii korduvaid tulemusi. Puhtas vees mõõdetud tulemused ei langenud kokku ilmselt seetõttu, et ionisatsiooni mõjutavad ka väikesed lisandite kontsentratsioonid ning vee kvaliteet ei ole päevast päeva stabiilne, seega väga väikese hulga ionide poolt tekitatud ioontugevus on päevade vahel muutuv.

Ehkki varasemad uuringud on näidanud, et ionisatsiooniefektiivsus ESI allikas sõltub analüütide $pK_a^{H_2O}$, $\log P$ ja PA väärtustest [5], leiti töös korrelatsioon vaid PA ning ionisatsiooniefektiivsuse muutuse vahel hüppe alas (a). Metanoolis korrelatsioon a ja PA väärtuste vahel puudus. Selle seletuseks pakume kaks hüpoteesi. Esiteks võib vees ja metanoolis saadud erinev korrelatsioon näidata, et ionisatsioonimehhanismid ESI allikas toimuvad sõltuvalt lahustist erinevalt. Teisalt ei saa välistada võimalust, et vesilahustes saadud korrelatsioon võib olla juhuslik, sest uuritud analüüte oli vähe. Seega tuleks ionisatsiooniefektiivsuse ja prootonaafiinsuse sõltuvust vees uurida, laiendades analüütide valikut.

Lisaks on sobitatud $\log IE$ vs. pH graafikutelt näha, et ionisatsiooniefektiivsuste hüpe jääb kõigi analüütide puhul samasse piirkonda. Vesilahustes jääb hüpe vahemikku $pH^{H_2O} \approx 2,5 \dots 4,0$ ning metanoolilahustes vahemikku $pH^{MeOH} \approx 5,5 \dots 7,5$. Samas peaks teoreetiliselt olema hüppe asukoht sobitatud graafikudel määratud analüütide pK_a väärtuste poolt. Analüütide $pK_a^{H_2O}$ väärtused olid vahemikus 2,7 kuni 9,0 ning pK_a^{MeOH} väärtused vahemikus 5,16 kuni 10,25. See võib tähendada, et analüütide tegelikud pK_a väärtused ESI tilkades võivad muutuda ning nivelleeruda. Üheks põhjuseks võib olla ESI tilkade temperatuuri muutus. Selle kontrollimiseks teostatud spektrofotomeetrilised mõõtmised vesilahustes näitavad (tabel 3), et 50 °C juures on analüütide $pK_a^{H_2O}$ väärtused toatemperatuuriga võrreldes madalamad, kuid siiski mitte nii madalad kui valemi 10 sobitamisel saadud $pK_a^{H_2O}$ väärtused. Samas leiti, et töös kasutatud happeliste vesilahuste pH

50 °C juures praktiliselt ei muutu. Seega võib arvata, et lisaks temperatuuri muutusele mõjutavad analüüdi näiva pK_a erinevust tegelikust ka muud faktorid (nt laenguliig).

Mõõtmistest selgub veel, et ionisatsiooniefektiivsuste vahemik vees ja metanoolis on umbes sama lai. Samuti on mõlemas lahustis analüüte, mille ionisatsiooniefektiivsus uuritud pH vahemikus muutub väga vähe ning seega võib öelda, et nende ionisatsiooniefektiivsus on pH väärtusest sõltumatu. Analüütide omaduste põhjal saab öelda, et ionisatsiooniefektiivsused on pH väärtusest sõltumatud ühenditel, mis on hüdrofiilsemad (madalama $\log P$ väärtusega). Teisalt on analüüte, mille ionisatsiooniefektiivsus happelise ja aluselise keskkonna vahel muutub palju ehk nende ionisatsiooniefektiivsus on pH väärtusest sõltuv.

Samas selgub antud tööst ka see, et analüütide suhtelised ionisatsiooniefektiivsused sõltuvad väga palju nii lahustist kui ka lisandist (joonis 1). See tähendab, et analüütide ionisatsiooniefektiivsuste järjekord sipelghappe lisandiga metanoolilahuses erineb samade analüütide ionisatsiooniefektiivsuste järjekorrast sipelghappe vesilahuses. Samamoodi võib analüütide ionisatsiooniefektiivsuste järjekord muutuda ka ühe lahusti piires erinevate lisanditega lahustes. Seega peab lahusti ning lisandi mõju arvesse võtma ka kvantitatiivsete mudelite loomisel, sest analüütide suhtelised ionisatsiooniefektiivsused sõltuvad nii lahustist kui ka lisandist.

4.1.1. Ionisatsiooniefektiivsuste võrdlus kahel massispektromeetril

Töös võrreldi ionisatsiooniefektiivsusi kahe erineva ehitusega ESI allika puhul. Enamus mõõtmisi viidi läbi termilise fokuseerimisega ESI allikal, mis erineb tavalisest ESI-st selle poolest, et tal on lisaks kuivatusgaasile allika sees ionisatsiooniefektiivsuse parandamiseks ka kardingaas. Töö tulemustest selgub, et kahe masinaga mõõdetud ionisatsiooniefektiivsuste väärtused ei ole küll arvuliselt võrdsed, kuid nende vahel kehtib väga hea lineaarne seos. Sama järelduseni on jõutud ka meie uurimisgrupi varasemates ühe lahuse piires läbi viidud töödes [31]. Tänu heale korrelatsioonile on võimalik ühe masina tulemusi teisele üle kanda, kasutades teisendusi või koostades kahe punkti kalibratsiooni.

Saadud tulemused lubavad kinnitada, et analüüdi ionisatsiooniefektiivsus sõltub eeskätt analüüdi enda ja lahuse omadustest ning erinevate instrumentide disaini omapärad on lihtsasti arvesse võetavad. See võimaldab ühel masinal läbi viidud uurimuse tulemusi rakendada ka teistel instrumentidel. Näiteks saab eeldada, et selle töö tulemused kehtivad ka teistes uurimisgruppides läbiviidavate uuringute raames.

4.2. Pöörd-ESI nähtuse uurimine

Pöörd-ESI nähtust märgati vesilahustes kuuel analüüdil, kuid metanoolis vaid ühel. See näitab, et nähtus ilmneb eelistatult vesilahustes, kuid mõne analüüdi puhul ka metanoolis. Seejuures ei ole uuritud analüütide põhjal võimalik öelda, milline aine omadus või struktuuri tunnus pöörd-ESI soodustab. Selleks et teada saada, millistel analüütidel pöörd-ESI efekt esineb, tuleks uurida rohkem analüüte, mis on omavahel omadustelt ning struktuurilt sarnasemad ning jälgida nende käitumist kõrgetel pH väärtustel.

Käesolevas töös oli pöörd-ESI efekti näha nii 1 mM, 5 mM kui ka 10 mM ammoniaagi (pH väärtustel 9,37; 10,10 ja 10,29) vesilahuses. See tähendab, et kõikides ammoniaagi lahustes kasvas ionisatsiooniefektiivsus järsult võrreldes veidi madalamatel pH väärtustel puhverlahustega. Erandlikult tõusis 2-amino-2(hüdroksümetüül)-1,3-propaandiooli ionisatsiooniefektiivsus juba alates 1 mM ammooniumatsetaadi (pH = 6,60) lahusest.

Pöörd-ESI efekti esinemine ammoniaagi lahustes andis alust arvata, et oodatust kõrgem ionisatsiooniefektiivsus neis lahustes tekib tänu ammooniumadukti tekkele [19]. Selleks uuriti, kas ionisatsiooniefektiivsus kasvab, kui lahuses ammooniumiooni kontsentratsiooni tõsta. Selgus, et statistiliselt olulist erinevust 1 mM, 5 mM ja 10 mM ammoniaagi lahuse vahel enamikel analüütidel ei olnud. Samuti ei nähtud massispektris ammooniumadukti. Seega ei saa ammooniumadukti moodustumine olla ainus pöörd-ESI seletus.

Pöörd-ESI nähtust üritati esile kutsuda ka teist aluselist lisandit, metüülamiini, kasutades, mis sarnaselt ammooniumioonidele võib ionisatsiooniefektiivsust tõsta läbi aduktide moodustumise. Seejuures oli metüülamiiniga lahuse $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ vaid 7,90. Kasutatud 1 mM metüülamiin ei andnud oodatust kõrgemaid ionisatsiooniefektiivsusi, nagu ammoniaagi lahus. Samas ei nähtud ka analüütide adukti moodustumist metüülamiiniga, mida varasemalt on nähtud mitmetes töödes [32]. Kuna metüülamiini lisandiga lahuse $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ oli 7,90, mis on märkimisväärselt madalam ammoniaagi lahuste pH väärtustest, siis võib arvata, et pöörd-ESI efekt on siiski seotud lahuse aluselisusega, see tähendab hüdroksiidioonide hulgaga lahuses. Selleks, et toodud hüpoteesi kontrollida, tuleks teha lisamõõtmisi teiste lisanditega aluselistes ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} > 10$) lahustes. Paraku on ESI allikas kasutatavatele lisanditele ranged nõudmised (ptk 1.2.2) ning sobiva lisandi leidmine on keeruline.

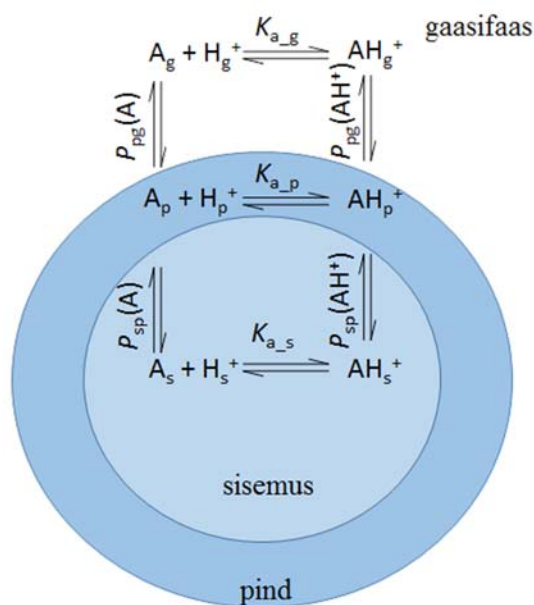
4.3. Lisandi koostise mõju uurimine

Lisandi koostise mõju uurimisest selgub, et lisanditel on väga erinev mõju analüütide ionisatsiooniefektiivsustele isegi lähedastel pH väärtustel. Seejuures on näha, et lisandi koostis mõjutab vees ning metanoolis toimuvaid ioniseerumise protsesse erineval määral.

Vesilahustes mõõdetud tulemustest selgub, et on lisandeid, mis annavad lähedastel pH väärtustel väga kokkulangevaid ionisatsiooniefektiivsusi. Näiteks oblikhape ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 2,75$) ning 5 mM sipelghappe ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 2,79$) lahustes mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused polnud statistiliselt oluliselt erinevad.

Teisalt on lisandeid, milles ionisatsiooniefektiivsused vesilahustes lähedastel pH väärtustel erinevad oluliselt. Näiteks 5 mM äädikhape ($\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}} = 3,15$) annab vees palju kõrgemaid ionisatsiooniefektiivsusi kõikidele analüütidele kui teised lahused lähedastel pH väärtustel. Samuti on enamikel analüütidel kõrgem ionisatsiooniefektiivsus 0,1 mM ja 1 mM sipelghappe lahuses võrreldes teiste lahustega lähedastel pH väärtustel.

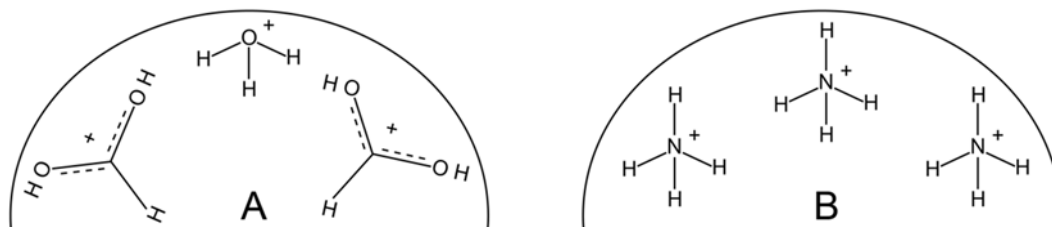
Need erisused annavad alust arvata, et ionisatsiooniprotsessides mängivad lisandid väga olulist rolli. Ehkki ESI allikas toimuvad ionisatsiooniprotsessid pole täpselt teada, on oletatavaid analüüdi protoneerumise viise illustreeritud joonisel 2.



Joonis 2. Analüüdi ioniseerumise võimalikud protsessid

Selle järgi võib analüüdi protoneerumine ESI protsessis toimuda kolmel erineval moel: tilga sisemuses (K_{a_s}), tilga pinnal (K_{a_p}) või gaasifaasis (K_{a_g}). Seega on võimalik, et analüüt läheb tilga pinnale kas protoneeritud kujul ($P_{sp}(AH^+)$) või neutraalses vormis ($P_{sp}(A)$), kus ta võib

samuti protoneeruda. Neutraalse analüüdi tilga pinnal protoneerumine sõltub omakorda sellest, milliste lisandite ioonid tilga pinnal superhappelise keskkonna moodustavad ning kui hästi nad suudavad analüüti protoneerida. Üks võimalik põhjus, miks happeliste vesilahuste ionisatsiooniefektiivsus on kõrgem kui lahustel, mis sisaldavad ammooniumiooni, seisneb tilga pinnale jõudva laenguliia olemuses (joonis 3).



Joonis 3. Tilga pinna mudelid happelise lisandi (A) ning aluselise lisandi (B) korral

Sel juhul tekib happeliste lisanditega lahustes laenguliig protoneeritud vee või happe molekulidest. Protoneeritud happed on aga väga tugevad happed ning loovad tilga pinnale superhappelise keskkonna. Näiteks protoneeritud sipelghappe ($[\text{HCOOH}]\text{H}^+$) $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{H}_2\text{O}}$ väärtus on alla -3 [33] ning seega protoneerib ta kõiki ained, mille $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{H}_2\text{O}}$ on kõrgem kui -3. Töös vastasid sellele kriteeriumile kõik analüüdid. Sama hüpoteesi järgi võib arvata, et lahustes, mis sisaldavad ammooniumiooni, tekib laenguliig mitte prootoni, vaid ammooniumioonidest. Kuna NH_4^+ $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{H}_2\text{O}}$ on 9,25 [34], siis protoneerib ta vaid väga tugevaid aluseid, mille $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{H}_2\text{O}}$ on kõrgem kui 9. Meie töös selliseid ühendeid ei olnud. Selline tilga pinna mudel seletab, miks happeliste lisanditega lahustes on kõrgem ionisatsiooniefektiivsus, kui lahustes, mis sisaldavad kasvõi vähesel määral ammooniumiooni.

Samas sõltub ionisatsiooniefektiivsus metanoolis lisandist oluliselt vähem. Meie töös oli seda märgata nii oblikhappe, sipelghappe kui ka äädikhappe puhul. Lisaks arvuliselt väiksematele ionisatsiooniefektiivsuste erinevustele ei olnud metanoolis nimetatud lisanditel kindlalt ka ionisatsiooni soodustavat või maha suruvat mõju. Lisandite mõju suund sõltus analüüdist.

Võib arvata, et metanoolis on lisandi mõju palju väiksem seetõttu, et metanooli pind on hüdrofoobsem kui veel. Seetõttu jõuab tilga pinnale ka vähem lisandi ioone, mis analüüdi protoneerumist mõjutaksid. Tilga pinna koostist nii vesi- kui ka metanoolilahustes on uurinud MD simulatsioonidega Ahadi *et al.* [2], kelle tulemused ammooniumioonide tilgas jaotumise uurimisel kinnitavad meie hüpoteesi. Selgub, et vesilahustes on tilga pinna lähedal ülekaalus ammooniumioonid, kuid metanoolilahustes neutraalsed metanooli molekulid.

Seega meie tulemustest järeldub, et vesilahustes on lisandil ionisatsiooniefektiivsusele suurem mõju kui lahuse pH väärtusel, kuid metanoolilahustes on pH mõju lisandi mõjust tugevam.

4.3.1. Lisandi koostises oleva vastasiooni mõju uurimine

Töö tulemustest selgub, et ionisatsiooniefektiivsus sõltub ka lisandi koostises oleva vastasiooni mõjust. Nii nagu koostise puhul, on ka vastasiooni mõju ionisatsiooni-efektiivsusele vees ning metanoolis erinev.

Ühelt poolt analüüsiti töös lisandeid, mille vastasioonid andsid väga sarnaseid ionisatsiooniefektiivsusi. Nii ei erinenud vesilahustes üksteisest oluliselt ammooniumatsetaadist ning ammooniumformiaadist valmistatud puhverlahuste ionisatsiooniefektiivsused.

Teisalt leidsime vees erinevuse ammooniumfluoriidi lisandiga. Enamik analüüte ioniseerusid ammooniumfluoriidi lahuses suuremal määral kui ammooniumatsetaadist valmistatud lahuses lähedasel pH väärtusel. Samas ei olnud ammooniumfluoriidi ionisatsiooniefektiivsust soodustavat efekti metanoolis.

Ühe hüpoteesi järgi sõltub ionisatsiooniefektiivsus vastasiooni ionipaardumise võimest. Atsetaat- ning formiaatiooni ionipaardumise võimed vees on sarnased, kuid fluoriidiooni võime ionipaare moodustada on madalam [35]. Seega atsetaat- ning formiaatioonid moodustavad protoneeritud analüütidega rohkem ionipaare ning ei lase protoneeritud analüüte tilga pinnale. Fluoriidioon seevastu ei ionipaardu nii suurel määral ning ei takista seega protoneeritud analüütide jõudmist tilga pinnale. Seetõttu on atsetaat- ning formiaatioonide puhul ionisatsiooniefektiivsus võrreldes fluoriidioonidega madalam. Suuremat mõju omab ionipaardumine ilmselt tütarilkaades, sest tütarilkaades on puhvri kontsentratsioon lahusti aurumise tõttu suurenenud. Kulonilise plahvatuse käigus kandub ematilgalt tütarilkaadele 2–5% massist, kuid 15–25% laengust [1].

Vastasiooni mõju on uurinud varem ka Koszinowski *et al.* [36] ning leidnud, et ionipaari moodustamise võime sõltub nii vastasiooni suuruselt kui ka lahusti omadustest. Nad leidsid, et väikesed ioonid on tugevamad ionipaardujad ning suruvad ionisatsiooniefektiivsust maha. Meie töös on nähtud efekt vastupidine – atsetaatioon tundub olevat tugevam ionipaarduja kui fluoriidioon, sest ionisatsiooniefektiivsused atsetaatpuhvril on madalamad kui lahuses, kus lisandi koostises on fluoriidioon. Samas kasutati nende töös orgaanilisi lahusteid, kus fluoriidioon on tugev ionipaarduja vastupidiselt meie uuritud vesikeskkondadele, milles fluoriidioon on madala ionipaari moodustamise võimega. Samuti võrdlesid Koszinowski *et al.* ionipaardumist erinevate protoonsete ning aprotoonsete lahustite vahel ning leidsid, et metanoolis ja vees pole ionipaardumine nii oluline kui aprotoonsetes lahustites. Ka meie ei näinud metanoolis ionipaardumise mõju, kuid see-eest sõltus ionisatsiooniefektiivsus

vesilahustes oluliselt vastasiooni omadustest. Seega lähevad Koszinowski tulemused meie tulemustega vastuollu ning vastasiooni mõjust täieliku selguse saamiseks tuleks ionisatsiooniefektiivust uurida rohkemate vastasioonide puhul.

4.4. Lisandi kontsentratsiooni mõju uurimine

Ammooniumatsetaadi erinevatel kontsentratsioonidel tehtud ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmistest selgub, et need on küllalt hästi kokkulangevad. See on ootuspärane, sest antud kontsentratsioonide juures ammooniumatsetaadi lahuse $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ muutub väga vähe. Statistiliselt olulist lahknevust erineva lisandi kontsentratsiooniga lahuste vahel täheldati mõne aine jaoks, kuid neil juhtudel erinesid ionisatsiooniefektiivsused maksimaalselt 0,3 log IE ühikut, mis on ionisatsiooniefektiivsuste mõõtmise puhul tühine.

Üllatuslikult selgub aga sipelghappe erineva kontsentratsiooniga lahustes mõõdetud tulemustest samuti, et ionisatsiooniefektiivsus ei sõltu sipelghappe kontsentratsioonist. Ehkki 0,1 mM ja 5 mM sipelghappe vesilahustes muutub $\text{pH}^{\text{H}_2\text{O}}$ 0,88 ühikut ning metanoolilahustes muutub pH^{MeOH} 1,24 ühikut, ei erine ionisatsiooniefektiivsused nendes sipelghappe lahustes üksteisest statistiliselt olulisel määral. Kuna 1 mM ja 0,1 mM sipelghappe lahuse ionisatsiooniefektiivsused võrreldes nende lähedastel pH väärtustel mõõdetud teistest lisanditest valmistatud lahuste ionisatsiooniefektiivsustega on oluliselt kõrgemad (ptk 4.3), on alust arvata, et pH-efektist tähtsam nii vees kui ka metanoolis on lisandi koostise mõju ionisatsiooniefektiivsusele.

Tulemusi kinnitab punktis 4.3 kirjeldatud laenguliia olemuse hüpotees. Sipelghappe lahustes võib tilga pinnale tekkida superhappeline keskkond protoneeritud sipelghappe näol. Selline keskkond protoneerib analüüte palju meelsamini kui puhverlahustes tekkiv ammooniumioonidest moodustunud laenguliig. Seetõttu on sipelghappe lahustes ionisatsiooniefektiivsus kõrgem kui sipelghappe ja ammooniumatsetaadi puhverlahustes lähedastel pH väärtustel.

Samas seerias mõõdeti ka 5 mM ja 50 mM oblikhappe mõju ionisatsiooniefektiivsusele. Ehkki varem on positiivses režiimis märgatud kangete happeliste lahuste ionisatsiooni maha suruvat toimet [5], siis töös nähti seda vaid üksikute analüütide puhul. Seega võib ka oblikhappe puhul väita, et ionisatsiooniefektiivsus on lahuse kontsentratsioonist sõltumatu, kui mõõta tavalistel ESI allikas kasutatavatel lisandi kontsentratsioonidel.

4.5. Ionisatsiooniefektiivsuste modelleerimine

Kuna erinevate analüütide ionisatsiooniefektiivsused ESI allikas on väga erinevad, siis on kvantitatiivsete analüüside läbiviimiseks vaja standardaineid. Sageli pole standardained kättesaadavad (ebastabiilsed ühendid, esmakordselt sünteesitud või eraldatud ühendid jne). Ideaalis oleks kõikidel maailma massispektrometristidel vaja ühte ennustusmudelit, mille abil saaks iga uue analüüdi sisaldust lahuses määrata ilma standardaineteta.

Ionisatsiooniefektiivsuste modelleerimise eesmärgil uuritaksegi maailma eri paigus ionisatsiooniefektiivsuste sõltuvust nii analüüdi ja lahuse omadustest kui ka masina disaini ja mõõtmisparameetrite eripäradest. Käesoleva töö tulemused näitavad, et oluline on modelleerimisel arvesse võtta lahusti ning lisandi eripärasid. Järgmiseks etapiks võiks olla suurema hulga ainete baasil peamiste lahuse omaduste arvesse võtmine ionisatsiooniefektiivsuste ennustusmudelil.

Samas annab töö ka kinnitust, et modelleerimisel on väga lihtne arvesse võtta mõõtevahendite disaini eripärasid ning ei pea arvestama lisandi kontsentratsiooni mõju.

KOKKUVÕTE

Töö eesmärk oli uurida, kuidas mitmed lahuse ning lisandi omadused mõjutavad ionisatsiooniefektiivsust ESI allikas. Seejuures ei olnud varem uuritud lahuse pH ja lisandite mõju nii laias pH vahemikus nii paljude erinevate lisanditega ei vees ega metanoolis.

Töö tulemustest selgus, et ionisatsiooniefektiivsus ESI allikas on lahuse pH väärtusest sõltuv teatud pH väärtuste vahemikus nii vees kui metanoolis. Seejuures tuleb arvestada, et kõrgetel pH väärtustel esineb pöörd-ESI efekt vesilahustes paljude ning metanoolilahustes üksikute analüütide puhul.

Lisandi mõju uurimisel selgus, et vesilahuste ionisatsiooniefektiivsust mõjutab lähedastel pH väärtustel lisandi koostis rohkem kui lahuse pH. Siinkohal pakkusime selgituseks hüpoteesi laenguliia erinevusest tilga pinnal happelist lisandit sisaldavates lahustes võrreldes ammoniumiooni sisaldavate lahustega (joonis 3). Hüpoteesi järgi moodustub laenguliig happeliste lisandite puhul protoneeritud happe või vee molekulidest, mis tõstavad ionisatsiooniefektiivsust neutraalsete analüütide tilga pinnal protoneerimise teel. Seevastu on ammoniumioone sisaldavad lahused lähedasel pH väärtusel ionisatsiooniefektiivsus madalam, sest ammoniumioonid neutraalset analüüti tilga pinnal ei protoneeri.

Peale selle leiti, et ionisatsiooniefektiivsust mõjutavad ka lisandi koostises oleva vastasiooni omadused. Arvatavasti on erinev ionisatsiooniefektiivsus mõjutatud vastasiooni võimest moodustada ioonpaare. Kui vastasioon on tugev ioonpaarduja, siis surub ta ionisatsiooniefektiivsust maha ning vastupidi.

Samuti selgub lisandi kontsentratsiooni mõju uurimisest ning masinavahelistest katsetest, et töös mõõdetud ionisatsiooniefektiivsused on kergesti ülekantavad ka teistesse laboritesse.

Töö tulemuste põhjal tehtud järeldused on samm edasi mõistmaks, millest sõltub ionisatsiooniefektiivsus ESI allikas. Tulemustest selgub, et ionisatsiooniefektiivsuste modelleerimisel tuleb lisaks analüüdi omadustele arvestada ka mitmeid lahustite ja lisandite iseärasusi.

SUMMARY

Ionization efficiency dependence on solvent pH and additives in ESI source

Electrospray ionization source (ESI) is an irreplaceable analytical tool, since it enables to couple two powerful analytical instruments – mass spectrometry (MS) and liquid chromatography (LC). Although LC/ESI/MS is widely used, the processes behind ESI ionization are not fully understood.

The ionization efficiency in ESI source is found to be dependent on the characteristics of the different analytes and solvents, such as the pK_a value of analytes, the pH value and composition of solvents. The previous studies have focused on finding ionization efficiency dependence in solvent mixtures containing both water and organic solvent.

In this study we simplified the systems and measured ionization efficiencies in pure water and methanol. We measured the ionization efficiencies of 10 analytes in 28 aqueous solutions of different composition and pH^{H_2O} from 1,42 to 10,29. The same analytes were measured in 14 methanolic solutions of different composition and pH^{MeOH} from 3,63 to 12,24.

We found that the ionization efficiencies of most analytes are pH dependent in specific pH range in both water and methanol. Still, wrong-way-round ionization has to be taken into account for most analytes in aqueous solutions and for some analytes in methanolic solutions.

However, we found that the effect of additives outweighs the effect of pH in aqueous solutions. We hypothesized that in case of acidic additives, the excess charge on the droplet surface is due to protonated acid and water molecules and therefore enhances ionization efficiency of analytes significantly.

We also found that different counter-ions do not affect ionization efficiency similarly. The difference is thought to result from the unequal ability of counter-ions to form ion pairs.

In addition, we confirmed that ionization efficiencies between different instruments are easily comparable and that the concentration of additives in the usual ESI concentration range does not affect ionization efficiency of analytes.

To sum up, in this study we focused on many solvent effects that influence the ionization efficiency in ESI process. The results are essential for developing a prediction model for ionization efficiencies.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

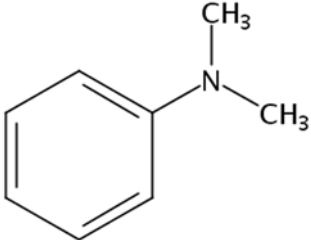
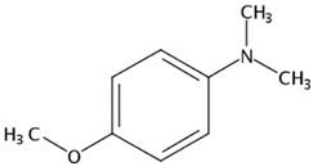
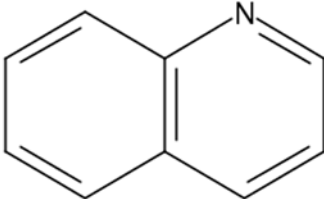
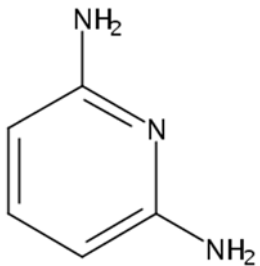
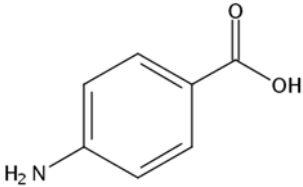
1. Cole, R. B. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, US, 2010.
2. Ahadi, E.; Konermann, L. Ejection of Solvated Ions from Electrosprayed Methanol/Water Nanodroplets Studied by Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (24), 9354–9363.
3. Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A. D.; Vahidi, S. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (1), 2–9.
4. Van Berkel, G. J.; Zhou, F.; Aronson, J. T. Changes in Bulk Solution pH Caused by the Inherent Controlled-Current Electrolytic Process of an Electrospray Ion Source. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1996**, *162*, 55–67.
5. Kostianinen, R.; Kauppila, T. J. Effect of Eluent on the Ionization Process in Liquid chromatography–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (4), 685–699.
6. Iribarne, J. V.; Thomson, B. A. On the Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64* (6).
7. Thomson, B. A.; Iribarne, J. V. Field Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric Pressure. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71* (11), 4451–4463.
8. Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240.
9. Mansoori, B. A.; Volmer, D. A.; Boyd, R. K. “Wrong-Way-Round” Electrospray Ionization of Amino Acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1120–1130.
10. Hiraoka, K.; Murata, K.; Kudaka, I. Do the Electrospray Mass Spectra Reflect the Ion Concentrations in Sample Solution? *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **1995**, *43* (3), 127–138.
11. Henriksen, T.; Juhler, R. K.; Svensmark, B.; Cech, N. B. The Relative Influences of Acidity and Polarity on Responsiveness of Small Organic Molecules to Analysis with Negative Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16* (4), 446–455.
12. Zhou, S.; Cook, K. D. Probing Solvent Fractionation in Electrospray Droplets with Laser-Induced Fluorescence of a Solvatochromic Dye. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (5), 963–969.
13. Girod, M.; Dagany, X.; Boutou, V.; Broyer, M.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Mordehai, A.; Love, C.; Werlich, M.; Fjeldsted, J.; Stafford, G. Profiling an Electrospray Plume by Laser-Induced Fluorescence and Fraunhofer Diffraction Combined to Mass Spectrometry: Influence of Size and Composition of Droplets on Charge-State Distributions of Electrosprayed Proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (26), 9389.
14. Zhou, S.; Prebyl, B. S.; Cook, K. D. Profiling pH Changes in the Electrospray Plume. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (19), 4885–4888.
15. Gibson, S. C.; Feigerle, C. S.; Cook, K. D. Fluorometric Measurement and Modeling of Droplet Temperature Changes in an Electrospray Plume. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (1), 464–472.

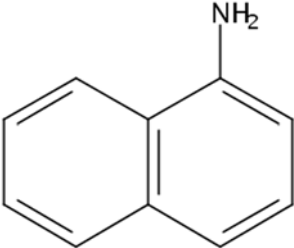
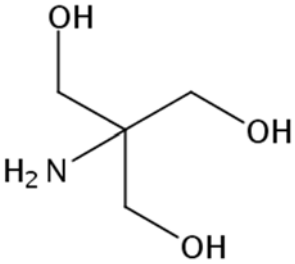
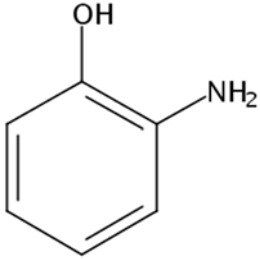
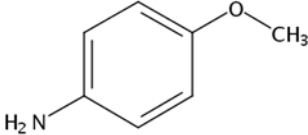
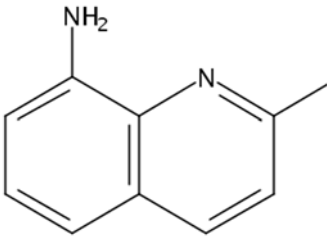
16. Soleilhac, A.; Dagany, X.; Dugourd, P.; Girod, M.; Antoine, R. Correlating Droplet Size with Temperature Changes in Electrospray Source by Optical Methods. *Anal. Chem.* **2015**, 87 (16), 8210–8217.
17. Kamel, A. M. Effects of Mobile-Phase Additives, Solution pH, Ionization Constant, and Analyte Concentration on the Sensitivities and Electrospray Ionization Mass Spectra of Nucleoside Antiviral Agents. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 5481–5492.
18. Zhou, S.; Cook, K. D. Protonation in Electrospray Mass Spectrometry: Wrong-Way-Round or Right-Way-Round? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, 11 (11), 961–966.
19. Guevremont, R.; Siu, K. W. M.; Le Blanc, J. C. Y.; Berman, S. S. Are the Electrospray Mass Spectra of Proteins Related to Their Aqueous Solution Chemistry? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, 3, 216–224.
20. Yang, X. J.; Qu, Y.; Yuan, Q.; Wan, P.; Du, Z.; Chen, D.; Wong, C. Effect of Ammonium on Liquid- and Gas-Phase Protonation and Deprotonation in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *The Analyst* **2013**, 138 (2), 659–665.
21. Humeres, E.; Quijano, J.; Sierra, M. M. de S. A Method to Correct the pH and Acid Dissociation Constants of Weak Aqueous Acid Solutions with Temperature. *J. Braz. Chem. Soc.* **1990**, 1 (3), 99–104.
22. Leito, I.; Herodes, K.; Huopolahti, M.; Virro, K.; Künnapas, A.; Kruve, A.; Tanner, R. Towards the Electrospray Ionization Mass Spectrometry Ionization Efficiency Scale of Organic Compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, 22 (3), 379–384.
23. Kruve, A.; Kaupmees, K.; Liigand, J.; Leito, I. Negative Electrospray Ionization via Deprotonation: Predicting the Ionization Efficiency. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (10), 4822–4830.
24. Liigand, J.; Kruve, A.; Leito, I.; Girod, M.; Antoine, R. Effect of Mobile Phase on Electrospray Ionization Efficiency. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, 25 (11), 1853–1861.
25. De Ligny, C. L.; Luykx, P. F. M.; Rehbach, M.; Wieneke, A. A. The pH of Some Standard Solutions in Methanol and Methanol-Water Mixtures at 25°. *J. R. Neth. Chem. Soc.* **1960**, 79, 699–726.
26. Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score; <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties#> viimati alla laetud 10.05.2016.
27. ACE and JChem acidity and basicity calculator; <https://epoch.uky.edu/ace/public/pKa.jsp> viimati alla laetud 10.05.2016.
28. Rived, F.; Rosés, M.; Bosch, E. Dissociation Constants of Neutral and Charged Acids in Methyl Alcohol. The Acid Strength Resolution. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 374, 309–324.
29. NIST Standard Reference Database Number 69; <http://webbook.nist.gov/chemistry/> viimati uuendatud 09.02.2015.
30. Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed.; Pearson Education Limited: Harlow, England, 2005.
31. Liigand, J.; Kruve, A.; Liigand, P.; Laaniste, A.; Girod, M.; Antoine, R.; Leito, I. Transferability of the Electrospray Ionization Efficiency Scale between Different Instruments. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, 26 (11), 1923–1930.

32. Zhao, J. J.; Yang, A. Y.; Rogers, J. D. Effects of Liquid Chromatography Mobile Phase Buffer Contents on the Ionization and Fragmentation of Analytes in Liquid Chromatographic/ion spray Tandem Mass Spectrometric Determination. *J. Mass Spectrom.* **2002**, 37 (4), 421–433.
33. Enami, S.; Stewart, L. A.; Hoffmann, M. R.; Colussi, A. J. Superacid Chemistry on Mildly Acidic Water. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1 (24), 3488–3493.
34. Acids and Bases: pKa and pKb;
http://www.sanderkok.com/techniques/laboratory/pka_pkb.html#viimati_uuendatud
 11.08.2007.
35. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, US, 1997.
36. Koszinowski, K.; Lissy, F. Counter-Ion and Solvent Effects in Electrospray Ionization of Solutions of Alkali Metal and Quaternary Ammonium Salts. *Int. J. Mass Spectrom.* **2013**, 354-355, 219–228.

LISAD

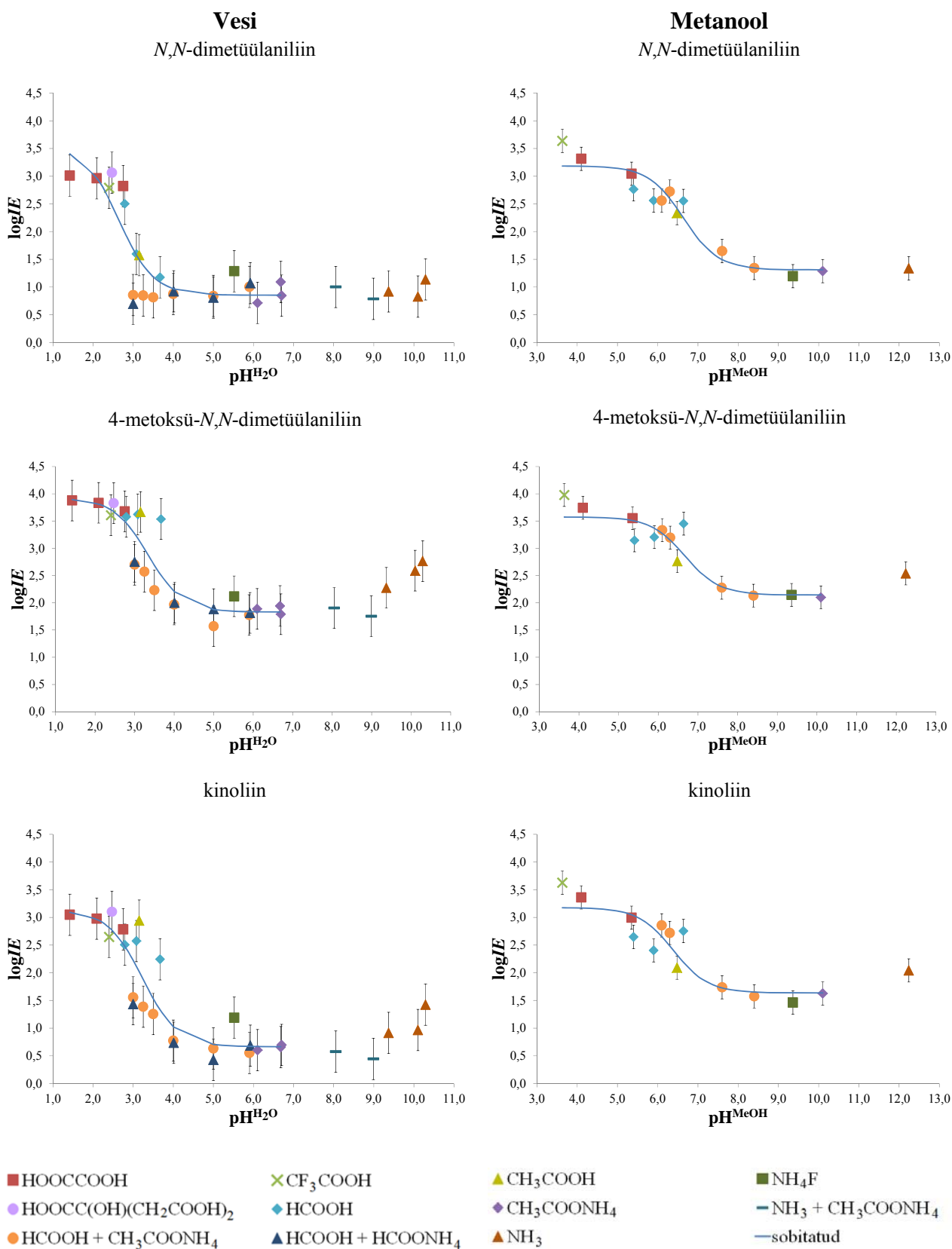
Lisa 1. Töös kasutatud analüütide struktuurvalemid ning omadused

Analüüt	m/z	Struktuurvalem	$pK_a^{H_2O}$ [27]	logP [26]	PA [29] (kJ/mol)	pK_a^{MeOH} [28]
<i>N,N</i>- dimetüülaniliin	122		5,0	2,0	941,1	5,2
4-metoksü-<i>N,N</i>- dimetüülaniliin	152		5,6	2,1	949,1	– ¹
kinoliin	130		4,5	1,9	953,2	5,2
2,6-diamino- püridiin	110		8,7	0,4	– ¹	– ¹
4-amino- bensoehape	138		2,7	0,9	864,7	10,3

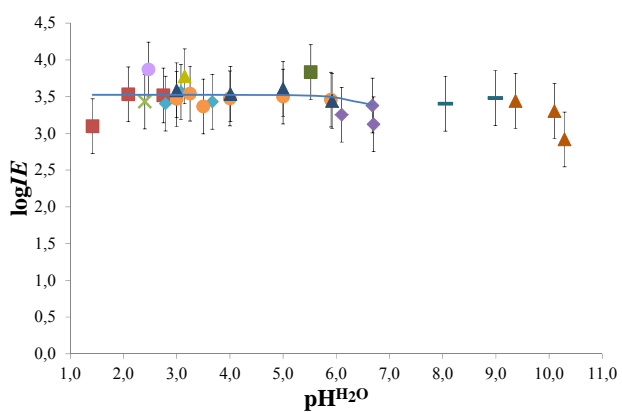
1-naftüülamiin	144		2,7	2,6	907	5,4
2-amino-2-(hüdroksümetüül)-1,3-propaandiool	122		9,0	-2,1	– ¹	– ¹
2-aminofenool	110		4,5	1,2	898,8	– ¹
4-metoksüaniliin	124		5,1	1,1	900,3	6,9
2-metüül-8-aminokinoliin	159		4,7	1,4	– ¹	– ¹

¹– Väärtust ei leitud kirjandusest ega andmebaasidest

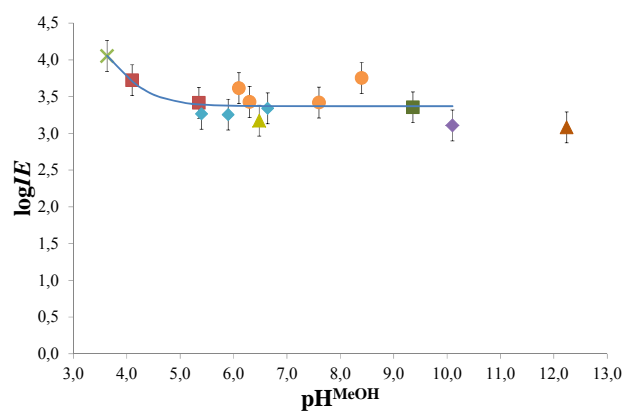
Lisa 2. Kõikide analüütide $\log IE$ vs. pH graafikud vees ja metanoolis koos sobitatud graafikutega. Veavälbad on vastava lahusti piires saadud suurima kogutud standardhälbe väärtusega. Vesilahuste s on 0,37 ning metanoolilahuste s on 0,21



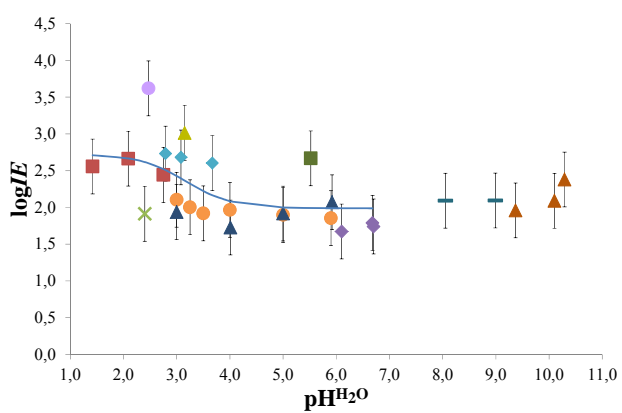
2,6-diaminopüridiin



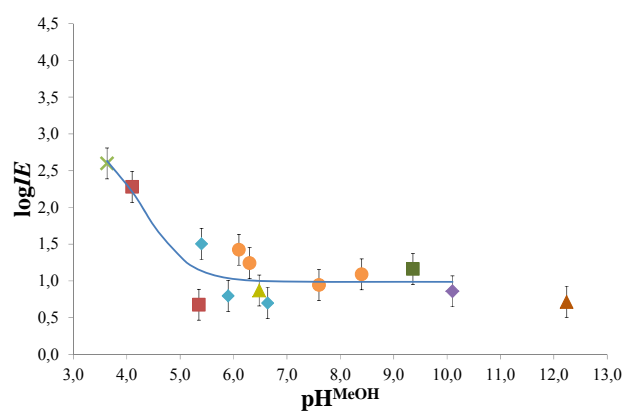
2,6-diaminopüridiin



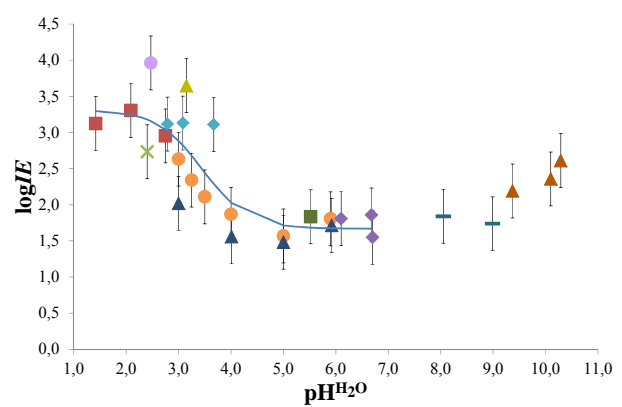
4-aminobensoehape



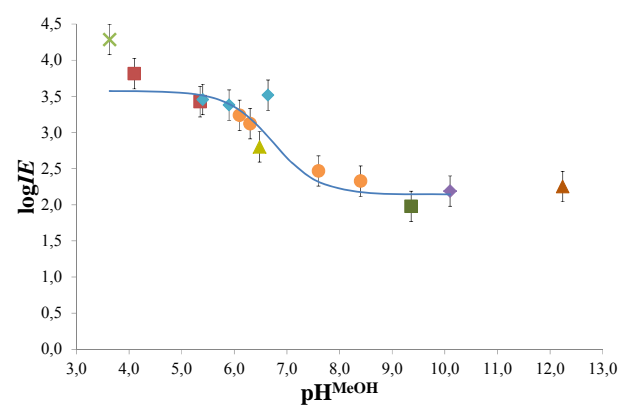
4-aminobensoehape



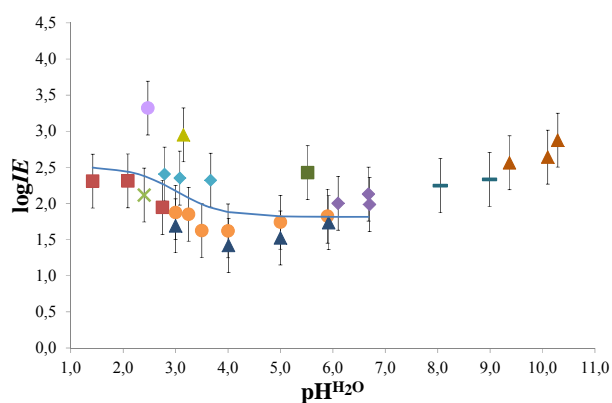
1-naftüülamiin



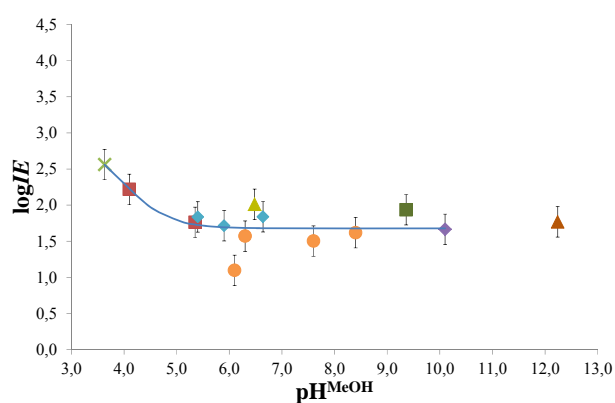
1-naftüülamiin



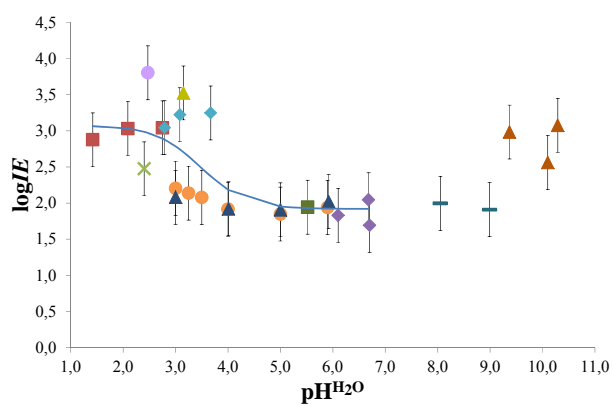
2-amino-2(hüdroksümetüül)-1,3-propaandiool



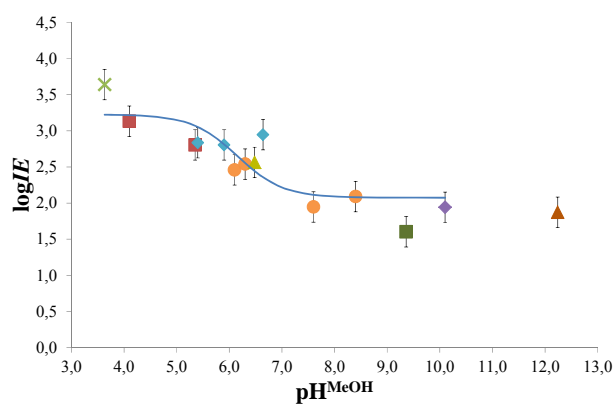
2-amino-2(hüdroksümetüül)-1,3-propaandiool



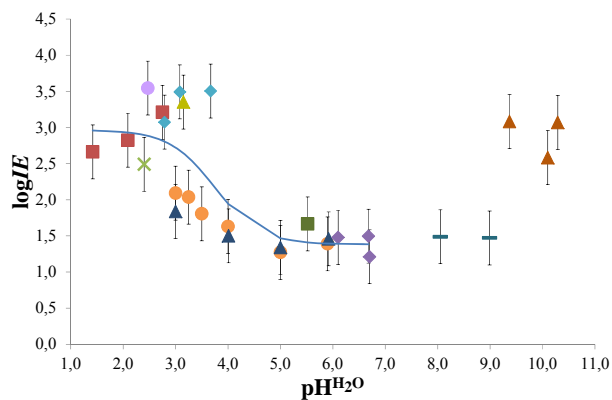
2-aminofenool



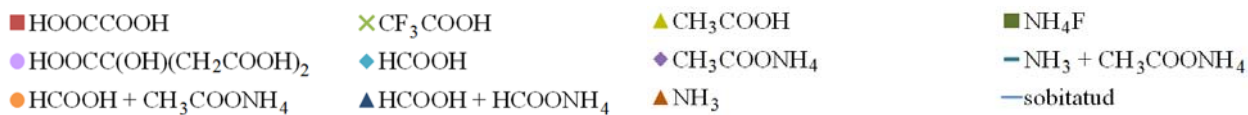
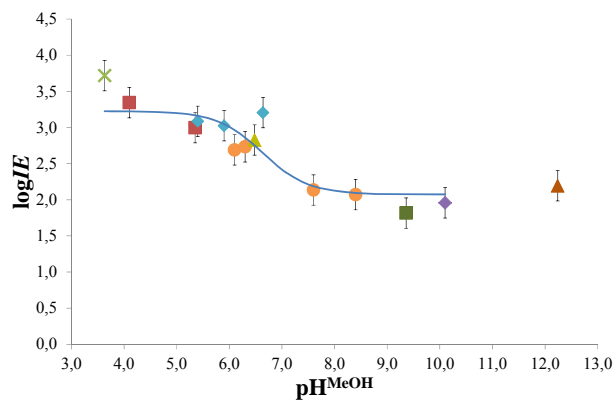
2-aminofenool

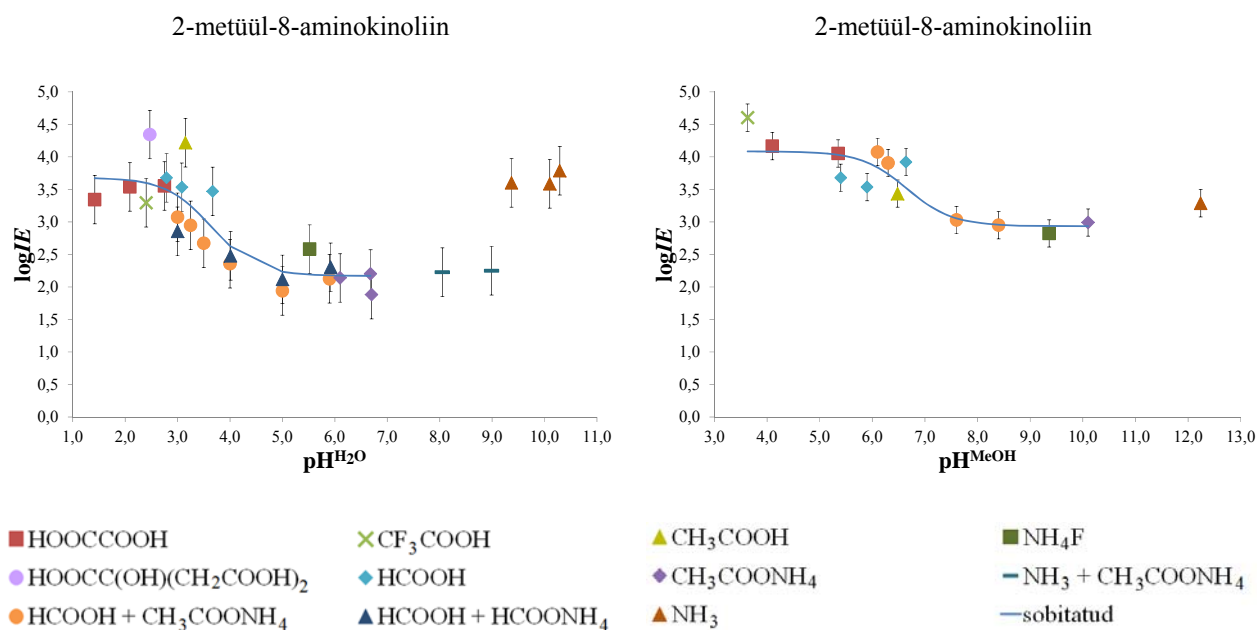


4-metoksüaniliin



4-metoksüaniliin

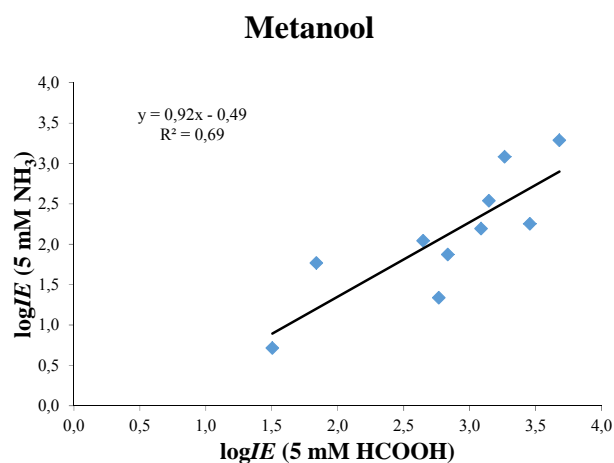
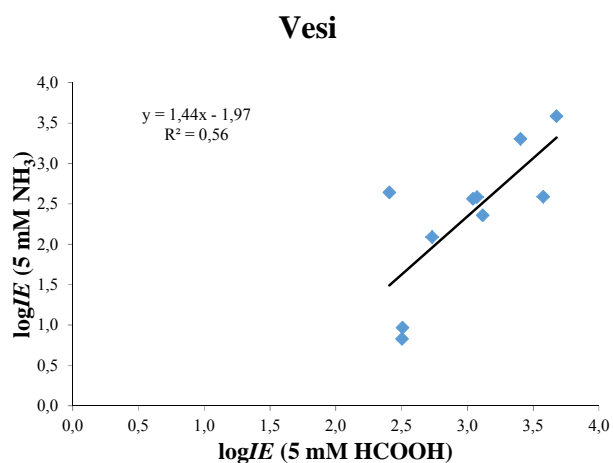




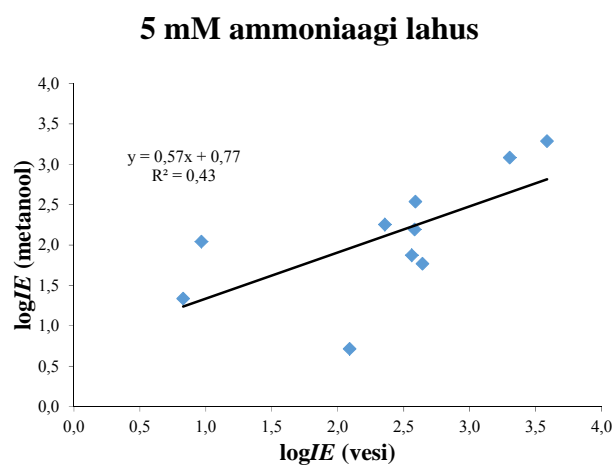
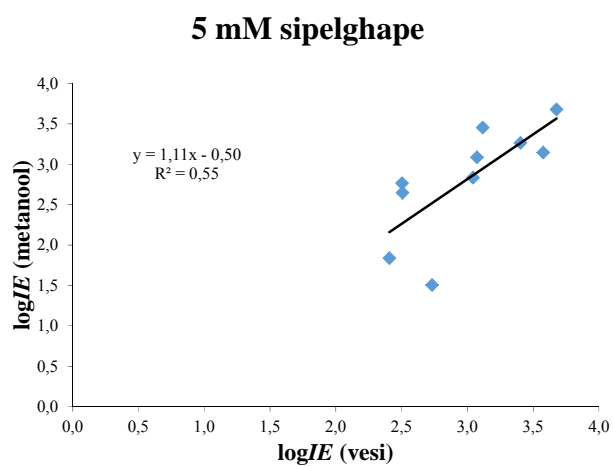
Lisa 3. $\log IE$ vs. pH graafikutele valemi 10 sobitamisel saadud kordajate a , b ja $pK_a^{H_2O}$ väärtused vees ja metanoolis

Analüüt	vesi			metanool		
	a	b	$pK_a^{H_2O}$	a	b	pK_a^{MeOH}
N,N-dime tüülaniliin	2,70	0,85	2,64	1,88	1,31	6,64
4-metoksü-N,N-dimetüülaniliin	2,09	1,83	3,34	1,43	2,14	6,67
kinoliin	2,46	0,66	3,24	1,54	1,64	6,39
2,6-diaminopüridiin	0,99	2,54	7,48	1,43	3,37	3,59
4-aminobensoehape	0,73	1,99	3,17	1,99	0,99	4,31
1-naftüülamiin	1,64	1,67	3,45	1,43	2,14	6,74
2-amino-2-(hüdrosümetüül)-1,3-propaandiool	0,70	1,82	3,03	1,27	1,68	3,99
2-aminofenool	1,16	1,92	3,48	1,15	2,07	6,15
4-metoksüaniliin	1,58	1,38	3,74	1,15	2,07	6,63
2-metüül-8-aminokinoliin	1,51	2,17	3,64	1,15	2,93	6,66

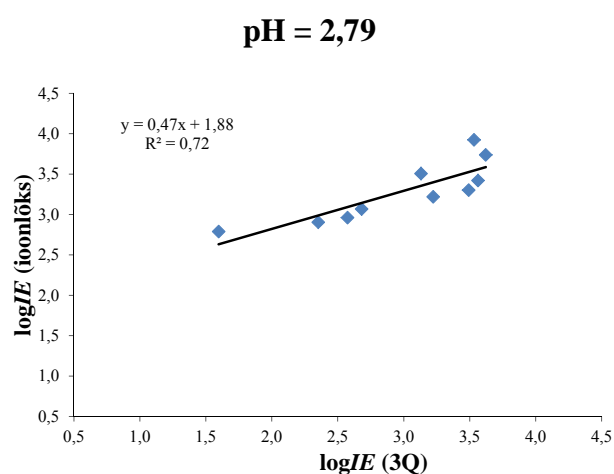
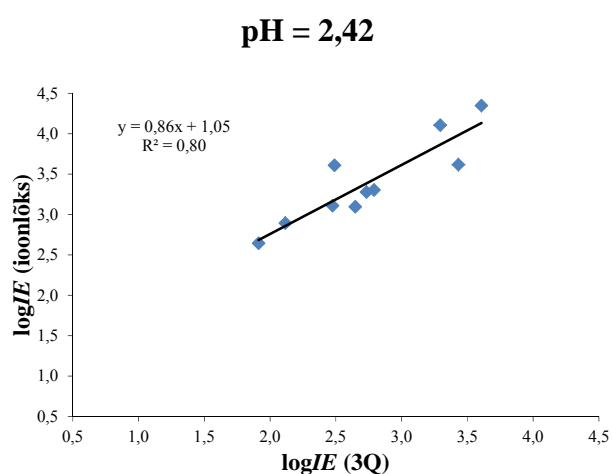
Lisa 4. Lisandi mõju korrelatsioonigraafikud



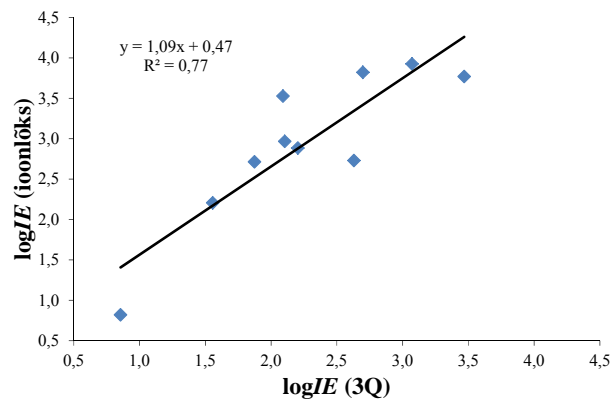
Lisa 5. Lahusti mõju korrelatsioonigraafikud



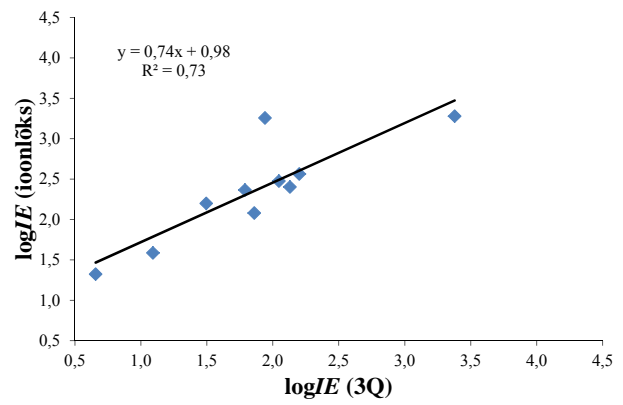
Lisa 6. Kahe instrumendi vahelised korrelatsioonigraafikud



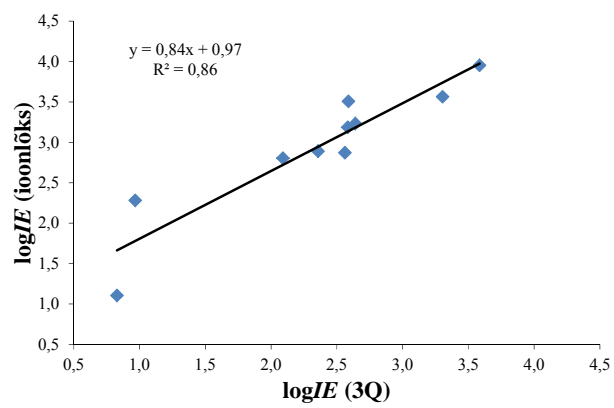
pH = 3,00



pH = 6,68



pH = 10,10



INFOLEHT

Lahuse pH ja lisandite mõju ionisatsiooniefektiivsusele ESI allikas

Elektropihustusionisatsioon (ESI) on laialt kasutatav ionisatsioonimeetod, mis võimaldab ühendada vedelikkromatograafia (LC) ja massispektromeetria (MS). Vaatamata rohkele kasutusele ei ole täpselt teada, millest analüütide ionisatsiooniefektiivsus ESI protsessi käigus sõltub. Töö eesmärk oli uurida, kuidas mõjutavad ionisatsiooniefektiivsust erineva koostise ja pH väärtusega lahused ning lisandi kontsentratsioon. Tulemustest selgus, et ionisatsiooniefektiivsus ESI allikas sõltub nii lahusti ja lisandi valikust kui ka lahuse pH väärtusest. Seejuures on vesilahustes lisandi mõju olulisem kui pH mõju. Samas leiti, et lisandi kontsentratsioon ionisatsiooniefektiivsust oluliselt ei mõjuta.

Märksõnad: massispektromeetria, elektropihustusionisatsioon, ionisatsiooniefektiivsus, lahusti mõjud

Ionization efficiency dependence on solvent pH and additives in ESI source

Electrospray ionization (ESI) is a widely used ionization technique, since it enables to connect liquid chromatography (LC) to mass spectrometry (MS). Despite the popularity, the processes behind ionization efficiency in ESI mechanism are still a mystery. The aim of this study was to find out how the ionization efficiency is affected by the pH and composition of the solvents. We found that ionization efficiency is dependent on the choice of solvent and additives as well as the pH of the solvent. Moreover, additives have stronger effect on water phase ionization efficiencies than the pH of the solvent. On the other hand, the ionization efficiency is not influenced by the concentration of additives.

Keywords: mass spectrometry, electrospray ionization, ionization efficiency, solvent effects

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Mari Sild**,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Lahuse pH ja lisandite mõju ionisatsiooniefektiivsusele ESI allikas**“, mille juhendajad on **Anneli Kruve** ja **Jaanus Liigand**,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2016** kuni **31.05.2018**.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **26.05.2016**